Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Michael Arnold

# Lektinhistochemische und immuncytochemische Untersuchungen zur Charakterisierung hormonbildender Zellen der Adenohypophyse der Ratte

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MARTIN WITT
aus Göttingen

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0063

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Michael Arnold

# Lektinhistochemische und immuncytochemische Untersuchungen zur Charakterisierung hormonbildender Zellen der Adenohypophyse der Ratte

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MARTIN WITT
aus Göttingen

1986

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. med. M. Siess |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. med. Ch. Klessen |
| 2. Berichterstatter: | Professor Dr. med. E. Kaiserling |

gedruckt 1986 bei H.-J. Köhler , Reprografischer Betrieb , Tübingen

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S


Abkürzungen
Bezugsquellen
Teil I Textteil

1. Einleitung....1
1.1. Allgemeine Vorbemerkung....1
1.2. Die Hormone der Hypophyse....2
1.3. Histologisch-histochemische Differenzierung hormonbildender Zellen des Hypophysenvorderlappens....2
1.4. Die Glykoproteinhormone des Hypophysenvorderlappens....4
1.4.1. Nachweis von Kohlenhydratbausteinen mit Lektinen....4
1.4.2. Die Funktion des Kohlenhydratanteils in Glykoproteinhormonen....5
1.5. Fragestellung....5

2. Material und Methoden....6
2.1. Versuchstiere, Fixierungsgemische, Materialgewinnung....6
2.2. Lektinhistochemische Untersuchungen....7
2.2.1. Kontrollen für die Lektinspezifität....7
2.3. Neuraminidasetest....9
2.4. Alkali-Behandlung der Schnitte....9
2.5. Säure-Behandlung der Schnitte....10
2.6. Perjodsäureoxidation der Schnitte....10
2.7. Immuncytochemische Methoden....11
2.8. Kombination lektinhistochemischer und immuncytochemischer Methoden....12

3. Befunde....14
3.1. Fixierungsgemische....14
3.2. Ergebnisse der lektinhistochemischen Untersuchungen....14
3.3. Neuraminidase-Vorbehandlung der Schnitte....16
3.4. Kontrollen....17
3.5. Alkali-Behandlung der Schnitte....18
3.6. Perjodsäureoxidation der Schnitte....18
3.7. Säure-Behandlung der Schnitte....18
3.8. Kontrollen....18

3.9. Ergebnisse der immuncytochemischen Untersuchungen.....20
3.9.1. Thyrotrope Zellen.....20
3.9.2. Gonadotrope Zellen (FSH und LH).....20
3.10. Ergebnisse der kombinierten lektinhistochemischen und immuncytochemischen Untersuchungen.....21
3.10.1. Neuraminidase/Lektine und Anti-ß-LH.....21
3.10.2. Neuraminidase/Lektine und Anti-ß-FSH.....22
3.10.3. Neuraminidase/Lektine und Anti-ß-TSH.....23

4. Diskussion.....26
4.1. Allgemeine Vorbemerkung.....26
4.2. Struktur der Glykoproteinhormone.....26
4.2.1. Aufbau der Kohlenhydratketten.....27
4.3. Identifizierung der Zellen des HVL aufgrund histologisch-histochemischer Kriterien.....28
4.3.1. Nachweis neutraler Kohlenhydratreste.....28
4.3.2. Nachweis saurer resp. basophiler Kohlenhydratreste.....29
4.3.3. Immuncytochemische Methoden.....29
4.3.4. Lektinhistochemische Methoden.....30
4.3.4.1. Historischer Überblick.....31
4.3.4.2. Definition und Eigenschaften eines Lektins.....31
4.3.4.3. Die Avidin-Biotin/Peroxidase-Complex (ABC)-Methode.....33
4.3.4.4. Spezifität der Lektine.....34
4.3.4.5. Einfluß der Fixierung.....35
4.4. Diskussion der lektinhistochemischen Befunde.....36
4.4.1. Struktur und Bedeutung der Sialinsäuren.....39
4.4.1.1. Zur Funktion der Kohlenhydratkomponente, insbesondere des Sialinsäureanteils in Glykoproteinen.....40
4.4.1.2. Zur Wirkungsweise von Neuraminidase.....42
4.4.2. Perjodsäureoxidation der Schnitte.....43
4.4.3. Alkali-Behandlung der Schnitte.....45
4.4.4. Saure Hydrolyse.....45
4.5. Immuncytochemische Untersuchungen.....46
4.6. Kombination immuncytochemischer mit lektinhistochemischen Methoden.....47

5. Zusammenfassung.....52
6. Literaturverzeichnis.....54
7. Teil II Abbildungen

# A B K O R Z U N G E N

| | |
|---|---|
| ABC | Avidin-Biotin/Peroxidase-Complex |
| Asn | Asparagin |
| DAB | 3'-3'-Diaminobenzidin |
| EBR | Eisenbindungsreaktion |
| HVL | Hypophysenvorderlappen |
| PAP | Peroxidase-Antiperoxidase |
| PAS | Perjodic Acid-Schiff Reaktion |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |

Lektine

| | |
|---|---|
| DBA | Dolichos biflorus Agglutinin |
| PNA | Peanut Aggl. |
| PSA | Pisum sativum Aggl. |
| SBA | Soybean Aggl. |
| UEA I | Ulex europaeus I Aggl. |
| WGA | Wheat germ Aggl. |
| S-WGA | Succinyliertes WGA |

Zucker

| | |
|---|---|
| Fuc | L-Fucose |
| Gal | D-Galactose |
| GalNAc | N-Acetyl-Galactosamin |
| GlcNAc | N-Acetyl-Glucosamin |
| Man | D-Mannose |
| NANA | N-Acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure) |

Hormone

| | |
|---|---|
| ACTH | Corticotropin (Adrenocorticotropes Hormon) |
| FSH | Follitropin (Follikelstimulierendes Hormon) |
| LH | Lutropin (Luteotropes Hormon) |
| LTH | Lipotropin |
| PRL | Prolactin |
| STH | Somatotropin (GH, Wachstumshormon) |
| TSH | Thyrotropin (Thyrotropes Hormon) |

# B E Z U G S Q U E L L E N

Antikörper

| | |
|---|---|
| Anti-ß-FSH | NIP, Baltimore, MD, USA |
| Anti-ß-LH | NIP, Baltimore, MD, USA |
| Anti-ß-TSH | NIP, Baltimore, MD, USA |
| ABC-Kit | Vector, Burlingame, CA, USA |
| DAB-Reagens | Serva, Heidelberg |
| DePeX-Eindeckmittel | Merck, Darmstadt |
| N-Acetyl-Galactosamin | Serva, Heidelberg |
| N-Acetyl-Glucosamin | Serva, Heidelberg |
| α-L-Fucose | Serva, Heidelberg |
| D-Galactose | Serva, Heidelberg |
| α-D-Mannose | Serva, Heidelberg |
| Kaisers Glycerin-Gelatine | Merck, Darmstadt |
| Neuraminidase | Behring, Marburg |
| Normales Schafserum | Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach |
| Osmiumtetroxid | Merck, Darmstadt |
| Perjodsäure | Merck, Darmstadt |
| Schaf-Anti-Kaninchen-IgG | Brunschwig AG, Basel, Schweiz |
| PAP-Komplex | Medac, Hamburg |
| 4-Cl-1-Naphthol | Sigma, St.Louis, MO, USA |
| Lektine | Vector, Burlingame, CA, USA |

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Allgemeine Vorbemerkung

Die Hypophyse (Hirnanhangsdrüse, Glandula pituitaria) nimmt im Rahmen der endokrinen Regulationsvorgänge eine übergeordnete Stellung ein: Sie produziert in ihrem vorderen, drüsigen Anteil (Vorderlappen, Adenohypophyse) sog. glandotrope Hormone, welche die Tätigkeit nachgeordneter peripherer endokriner Organe steuern, d.h. diese zur Hormonbildung und Hormonabgabe an die Blutbahn stimulieren. Die Adenohypophyse ihrerseits unterliegt der Steuerung durch den Hypothalamus. Hier werden von Nervenzellen Steuerungshormone (releasing hormones und release inhibiting hormones) gebildet, die fördernd bzw. hemmend auf die Hormonbildung der Zellen im Hypophysenvorderlappen (HVL) einwirken. Die Kommunikation zwischen der Hypothalamus - Hypophysenachse und dem peripheren Organsystem wird durch einen Rückkoppelungsmechanismus geregelt: In den endokrinen Zentralorganen (Hypothalamus, Hypophyse) werden Informationen über die Hormonsekretion der peripheren endokrinen Organe erfaßt. Auf Änderungen der Produktionsmenge, gemessen an der Konzentration des betreffenden Hormons im Blut, reagieren Hypothalamus und Hypophyse mit einer Veränderung in der Ausschüttung ihrer entsprechenden stimulierenden und inhibierenden Hormone. Das Ziel dieser regulativen Eingriffe besteht darin, die Funktion peripherer endokriner Organe veränderten Rahmenbedingungen anzupassen. Anschauliche Funktionsmodelle der Wirkungsweise dieses Rückkoppelungssystems bieten die Folgen experimenteller Eingriffe im Tierversuch oder pathologischer Veränderungen an diesen Organen. So ist beispielsweise nach Gonadektomie eine Hypertrophie und entsprechend erhöhte Hormonausschüttung der die Keimdrüsen stimulierenden Zellen in der Hypophyse zu beobachten. Eine erhöhte ACTH-Produktion kann seine Ursache in der Unterfunktion des Zielorgans, der Nebennierenrinde, haben (Morbus Addison).

Histologisch - histochemische Untersuchungen an der Hypophyse im Tierexperiment werden vorzugsweise an der Hypophyse der Ratte durchgeführt. Diese stellt eine flache, zur Mitte etwas verdickte, leicht dachförmige Scheibe von etwa 10 mg Gewicht dar. Sie liegt an der Unterseite des Dienzephalons auf der Schädelbasis (Abb.1). Ihr drüsiger Anteil entsteht

durch dorsale Ausstülpung des embryonalen Mundhöhlendaches, der Rathke'schen Tasche. Diese wandert nach dorsal auf das Infundibulum zu, einer Aussprossung des Dienzephalons. In der weiteren Entwicklung entsteht durch Zellproliferation der dorsalen Wandabschnitte der Rathke'schen Tasche die Pars intermedia (Mittellappen), durch Zellvermehrung der vorderen Abschnitte die Pars distalis (Vorderlappen) der Adenohypophyse. Der Verbindungsstiel der Rathke'schen Tasche mit dem Mundhöhlendach degeneriert allmählich. Kleine Ausläufer der Pars distalis umwachsen später das Infundibulum und werden zur Pars infundibularis.

## 1.2. Die Hormone der Hypophyse

Die im Hypothalamus von neurosekretorisch aktiven Zellen gebildeten Hormone Adiuretin (ADH) und Oxytocin werden intraaxonal in den Hinterlappen transportiert und dort in erweiterten Axonen, den Herring-Körpern, gespeichert. Im Mittellappen wird das die Melanozyten stimulierende Melanotropin (MSH) gebildet. Dieser enthält im Gegensatz zur menschlichen Hypophyse bei der Ratte kein Kolloid. Der Hypophysenvorderlappen (HVL) der Ratte bildet die sog. effektorischen Hormone: Corticotropin (ACTH), Thyrotropin (TSH), Follitropin (FSH) und Lutropin (LH).

## 1.3. Histologisch - histochemische Differenzierung hormonbildender Zellen des Hypophysenvorderlappens

Ein über längere Zeit ungelöstes Problem betraf die zelluläre Lokalisation der Hormonbildung, d.h. die Klärung der Frage, welche Zellen welche Hormone bilden. Eine Zuordnung der Hormonbildung zu bestimmten differenzierbaren Zelltypen wurde zunächst mit klassischen färberischen Methoden unter Berücksichtigung morphologischer Kriterien versucht. Mittels der Trichromfärbungen (z.B. Azan, Mallory) wurden acidophile, basophile und chromophobe Zellen unterschieden. Auskunft über morphologisch - funktionelle Zusammenhänge lieferten vor allem pathologische Veränderungen hypophysärer Zellen, wie etwa die Tumoren bestimmter, färberisch

definierbarer Zelltypen im HVL mit der Entwicklung einer spezifischen klinischen Symptomatik; beispielhaft genannt seien das Cushing - Syndrom bei einer Vermehrung der basophilen Zellen und der Riesenwuchs resp. die Akromegalie bei Oberproduktion von Wachstumshormon bei Vorliegen eines acidophilen Adenoms.

Da jedoch histologische Färbungen nur ungenau Auskunft über die Hormonaktivität einer einzelnen Zelle geben können, stellte die Anwendung immuncytochemischer Techniken einen entscheidenden Fortschritt dar. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, bei welchem ein Antikörper gegen das im Gewebe gesuchte Hormon (= Antigen) in einer anderen Spezies gezüchtet und isoliert wird. Dieser Antikörper wird auf den Schnitt aufgebracht und nach seiner Bindung mit dem korrespondierenden Antigen mit einer Reihe von Folgereaktionen sichtbar gemacht (Abb.5). Dieses Verfahren erlaubt eine genaue zelluläre Lokalisation der Hormonbildung im HVL.

So sind die runden bis ovalen FSH- und LH- produzierenden Zellen homogen in der Pars distalis verteilt, wobei sie gehäuft am Vorderrand der Seitenlappen anzutreffen sind (Phifer et al. 1972). Die thyrotropen Zellen zeichnen sich durch einen hohen Anteil mehr polygonaler Formen aus. Sie sind ebenfalls diffus im Vorderlappen verteilt und reihen sich bevorzugt perlschnurartig an Kapillaren an.

Die Frage, welche Hormone von welchen Zellen gebildet werden, ist für Gonadotropine trotz Einsatzes immuncytochemischer Methoden bislang nicht eindeutig geklärt worden. Die Befürworter der "Eine-Zelle-Mehrere-Hormone"-These stützen sich auf Befunde, nach denen in einer Zelle gleichzeitig FSH und LH nachzuweisen sind (Herbert 1975a,b: Ratte; Herbert 1976: Rhesusaffe; Bugnon et al. 1977: Ratte). Weniger eindeutig beschreibt Moriarty (1976) im Hypophysenvorderlappen der Ratte mittels immuncytochemischer Technik drei funktionell verschiedene, gonadotrope Hormone produzierende Zelltypen. Im ersten werden FSH und LH gemeinsam gebildet; im zweiten Zelltyp reagieren entweder Anti-ß-FSH oder Anti-ß-LH, im dritten nur Anti-ß-FSH. Mirecka und Pearse (1971) beschreiben ebenfalls einzelne wenige Zellen, welche nur jeweils ein Gonadotropin produzieren, während die Mehrzahl der Zellen pluripotent ist, d.h.

diese Zellen sowohl FSH als auch LH produzieren. Childs (Moriarty) et al. (1982) beobachteten bei unreifen Ratten das gleichzeitige Vorkommen von ACTH und FSH im selben Zelltyp. Das die Nebennierenrinde stimulierende Corticotropin gehört zur Peptidreihe der ACTH/Lipoprotein-Familie. Es sind gleichzeitig mit ACTH in einer Zelle auch das lipotrope Hormon (LPH), MSH (Dubois und Gráf 1973) sowie ß-Endorphin (Vaudry et al.1980) immuncytochemisch lokalisiert worden. Die ACTH-Zellen stellen längliche mit bizarr ausgestreckten Fortsätzen versehene Zellformen dar. Ähnlich aussehende, sog. "folliculo-stellate-cells" produzieren das sog. S-100-Protein (Nakajima et al. 1980, Shirasawa et al. 1983), über dessen funktionelle Bedeutung bislang kaum etwas bekannt geworden ist.

### 1.4. Die Glykoproteinhormone des Hypophysenvorderlappens

Die Hormone des HVL werden aufgrund ihrer chemischen Struktur in Glykoprotein- und Proteohormone unterteilt. Zu den Glykoproteinhormonen gehören das TSH sowie die Gonadotropine FSH und LH. Die beiden Untereinheiten ($\alpha$- und ß-Kette) der Proteinkomponenten besitzen ihrerseits über Asparagin verknüpfte Kohlenhydratketten (Pierce 1974, Sairam und Papkoff 1974), deren Zuckerreste mit Hilfe von Perjodoxidations- und Methylierungstechniken identifiziert wurden (Kennedy 1974, Shome und Parlow 1974). Dabei zeigte sich, daß Fucose und Sialinsäure eine terminale Position einnehmen. Die Kohlenhydratketten der Glykoproteinhormone bestehen jeweils aus einer Kerneinheit, die aus den Monosacchariden N-Acetyl-Glucosamin und Mannose zusammengesetzt ist. Der variabel aufgebaute terminale Kohlenhydratanteil besteht aus den Monosacchariden N-Acetyl-Glucosamin, N-Acetyl-Galactosamin, Galactose, Sialinsäure und Fucose (Pierce 1974, Sairam und Papkoff 1974, Bedi et al. 1982; s.Abb. 2 und 3). Diese Zuckerreste können histochemisch einzeln mit jeweils für sie spezifischen Lektinen nachgewiesen werden (Sharon und Lis 1972).

#### 1.4.1. Nachweis von Kohlenhydratbausteinen mit Lektinen

Lektine sind Proteine oder Glykoproteine vorwiegend pflanzlicher Herkunft, die eine hohe Bindungsaffinität gegenüber für sie spezifischen Kohlenhydratbausteinen (vorwiegend Monosaccharide) besitzen (s.Abb.10). In histochemischen Verfahren können biotinylierte Lektine auf den Gewebsschnitt

aufgebracht werden, wobei sie sich an die für sie spezifischen Zuckerreste binden. In einem weiteren Schritt werden die Lektine von einem Avidin-Biotin/Peroxidase-Complex (ABC) gebunden und anschließend über ein geeignetes Detektorensystem sichtbar gemacht (Hsu und Raine 1982; Abb.6).

### 1.4.2. Die Funktion des Kohlenhydratanteils in Glykoproteinhormonen

Die Funktionen der Kohlenhydratketten im Glykoprotein bestehen einerseits darin, die räumliche Konformation des Moleküls aufrecht zu erhalten und es somit vor proteolytischen Abbauvorgängen zu schützen (Olden et al. 1982). Weiterhin stellen Kohlenhydratketten wesentliche Determinanten für Zell-Zell- bzw. Zell-Substrat-Kontakte dar. Die Bedeutung der einzelnen Kohlenhydratbausteine ist nur teilweise geklärt. So schützt beispielsweise die terminal gelegene Sialinsäure das Glykoproteinhormon vor vorzeitigem Abbau in der Leber (Morell et al. 1968, Suttajit et al. 1971). Aus einer Reihe von Untersuchungen geht hervor, daß die Kohlenhydratketten bei definierten Glykoproteinhormonen der Hypophyse, z.B. dem thyrotropen Hormon, nicht immer die gleiche Zusammensetzung hinsichtlich des Gehaltes an Galactose, Fucose und Sialinsäure aufweisen (Spiro 1970, Pierce 1974, Weintraub et al. 1980). Die Bedeutung dieser als Mikroheterogenität bezeichneten Unregelmäßigkeiten der Kohlenhydratkette für Sekretion und biologische Aktivität ist weitgehend unbekannt.

## 1.5. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einerseits histochemisch mit Hilfe biotinylierter Lektine die Kohlenhydratbausteine in den Zellen des HVL der Ratte zu identifizieren. Zum anderen soll versucht werden, mit einer kombinierten lektinhistochemischen und immuncytochemischen Technik eine Zuordnung bestimmter Zuckerreste zu den Glykoproteinhormone produzierenden HVL-Zellen (TSH-,FSH- und LH-Zellen) zu erreichen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Versuchstiere, Fixierungsgemische, Materialgewinnung

Die Untersuchungen wurden an Hypophysen von 70 Tage alten, 200-250g schweren männlichen Wistar-Ratten (Fa. Ivanovas, Kisslegg) durchgeführt. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten eine Standarddiät (Altromin(R)) und Wasser ad libitum. Die Tiere wurden durch Frakturierung der Halswirbelsäule und anschließende Dekapitation getötet. Anschließend wurden die Hypophysen mit einem Teil der Schädelbasis so rasch wie möglich in die Fixierungsflüssigkeit gebracht.

Folgende Fixierungsgemische wurden verwendet:

1. Pikrinsäure-Formol-Eisessig (Bouin, Romeis 1968, §304)
2. Kaliumdichromat-Natriumsulfat-Sublimat-Eisessig (Zenker, Romeis § 336)
3. Kaliumdichromat-Sublimat (Elftman , Romeis §1984)

Fixierungsdauer jeweils 24 Stunden bei Raumtemperatur.

4. Perfusion mit 4% Paraformaldehydlösung in Phosphatpuffer pH 7,4 15 min. Anschließend Immersionsfixierung für weitere 20 Tage in der gleichen Fixierungslösung.
Vor der Perfusion mit dem Fixierungsmittel wurde das Blutgefäßsystem mit Rheomakrodex 10% unter Zusatz von 0,2% Procain-HCl und 5000 IE Heparin/100 ml vorgespült (10 min).
5. Äthanol-Chloroform-Eisessig (Carnoy, Romeis §226). Fixierungsdauer 4 Stunden bei 4°C.

Die bei Verwendung sublimathaltiger Fixierungsgemische (2 und 3) im Gewebe auftretenden Sublimatniederschläge wurden an aufgezogenen Hypophysenschnitten mit alkoholischer Jodjodkali-Lösung entfernt. Anschließend wurden die Schnitte zur Dejodierung mit Natriumthiosulfat gebleicht und daraufhin kurz fließend gewässert (Einzelheiten s.Romeis §326, 327). Nach der Fixierung wurden die Präparate über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert (1-4), resp. in Äthanol gespült (5) und über Methylbenzoat und Benzol in Paraplast eingebettet. Schnittdicke 5 µm. Schnittebene horizontal. - Um ein Abschwimmen der Schnitte zuverlässig zu ver-

hindern, wurden die Schnitte auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen (Pappas, 1971; modifiziert nach Klessen und Rehbein 1974).

Zum Ausschluß der Mitreaktion endogener Avidin-bzw. Biotinvorkommen in der Hypophyse wurden einige Schnitte vor der Lektininkubation mit Avidin und Biotin versetzt (Avidin-Biotin-Blocking-Kit).

## 2.2. Lektinhistochemische Untersuchungen

Zum Nachweis individueller Kohlenhydratbausteine in Glykokonjugaten wurden die Schnitte mit einer Reihe verschiedener, für den nachzuweisenden Zucker jeweils spezifischer Biotin-konjugierter Lektine (Tab.1, S.8)inkubiert (vgl. Abb.6.). - Entparaffinierte und über die absteigende Alkoholreihe in Aqua demin. gebrachte Schnitte wurden in folgender Weise behandelt (nach Hsu und Raine 1982, modifiziert):

1. Einstellen der Schnitte für 30 min in 0,3% $H_2O_2$ in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), pH 7,6 (PBS-Lösung nach Williams 1977) zur Umsetzung endogener Peroxidase
2. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS mit Zusatz von 0,1 mM Calcium
3. Schnitte abtropfen lassen
4. Biotinyliertes Lektin (ca 100 µl) auf jeweils zwei dicht nebeneinander liegende Hypophysenschnitte mit der Pipette auftragen. Einwirkungszeit 60 min bei Raumtemperatur
5. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS
6. Inkubation der Schnitte für 45 min mit Avidin-Biotin/Peroxidase-Complex
7. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS
8. Peroxidase-Nachweis mit Diaminobenzidin-$H_2O_2$ (Graham und Karnovsky 1966)
9. Anschließend spülen der Schnitte 3x5 min in Aqua demin., entwässern und eindecken über Xylol in DePeX

### 2.2.1. Kontrollen für die Lektinspezifität

a. Kompetitive Hemmung: Die entsprechenden Lektine wurden vor dem Auf-

| Lektin | Herkunft | Konzentration | Spezifischer Kohlenhydratrest |
|---|---|---|---|
| Peanut-Agglutinin (PNA) | Erdnuß | 70 - 100 µg/ml | ß-D-Galactose-(1-3)-D-Galactosamin, D-Galactose |
| Pisum sativum-Aggl. (PSA) | Erbse | 100 µg/ml | α-D-Mannose > -D-Glucose > -D-Glucosamin |
| Soybean-Aggl. (SBA) | Sojabohne | 100 µg/ml | α-D-Galactosamin>ß-D-Galactosamin≫D-Galactose |
| Wheat germ Aggl. (WGA) | Weizenkeim | 100 µg/ml | ß-N-Acetyl-Glucosamin, Sialinsäure |
| Succinyliertes WGA (S-WGA) | Weizenkeim | 100 µg/ml | ß-N-Acetyl-Glucosamin |
| Dolichos biflorus Aggl. (DBA) | Helmbohne | 70 - 100 µg/ml | α-D-Galactosamin |
| Ulex europaeus Aggl. I (UEA I) | Stechginster | 70 - 100 µg/ml | α-L-Fucose |

Tabelle 1: Zusammenstellung der eingesetzten Lektine, ihrer Herkunft, der verwendeten Konzentration sowie ihrer spezifischen Zuckerreste

tropfen auf die Gewebsschnitte mit einer o,2 M Lösung ihrer spezifischen Zucker (s. Tab.1) für 30 min, 12 Std. bzw. 48 Std. inkubiert. Anschließend erfolgte die Schnittinkubation entsprechend Schritt 4-9.
b. Inkubation ohne Lektin. Schritt 1-3 und 5-9.
c. Inkubation ohne Avidin-Biotin/Peroxidase-Complex. Schritt 1-5 und 7-9.

## 2.3. Neuraminidasetest

Zum Nachweis von Sialinsäureresten in Sialoglykokonjugaten wurden die Schnitte mit Neuraminidase (Acylneuraminyl-Hydrolase, aus Vibrio cholerae, EC 3.2.1.18 ) bei 37°C für 4 bzw. 18 Stunden in der feuchten Kammer inkubiert. Die verwendete Neuraminidase ist vom Hersteller folgendermaßen charakterisiert: Das Enzympräparat besitzt eine Aktivität von 1U (Einheit)/ml, welche aus humanem saurem $\alpha_1$-Glykoprotein in 1 min bei 37°C und pH 5,5 1 µmol N-Acetylneuraminsäure abspaltet. Das Präparat ist in Natrium-Acetatpufferlösung (0,05 mol/l) pH 5,5 mit Zusatz von Natriumchlorid (154 mmol/l) und Calciumchlorid (9 mmol/l) gelöst. - Unmittelbar vor Gebrauch wurde diese Lösung mit dem gleichen bzw. doppelten Volumen 0,05 M Acetatpuffer, welcher 1% NaCl und 0,1% $CaCl_2 \cdot H_2O$ enthielt, verdünnt (Pearse 1972, verändert nach Klessen 1973). Kontrollschnitte wurden mit enzymfreier Pufferlösung unter sonst gleichen Bedingungen (Zeit, Temperatur) inkubiert. Die entsprechenden Lösungen wurden auf die Schnitte aufgetropft (ca 100 µl pro zwei bis drei Hypophysenschnitte). Im Anschluß an die Inkubation mit Neuraminidase resp. an die Behandlung mit enzymfreier Pufferlösung wurden die Schnitte 5 min in Leitungswasser und 3x2 min in Aqua demin. gespült und daraufhin der Zuckernachweis mittels biotinylierter Lektine (s.o.) durchgeführt.

## 2.4. Alkali-Behandlung der Schnitte

Vor Durchführung der Behandlung mit Neuraminidase wurden weitere Kontrollschnitte mit Alkali behandelt (0,5% KOH in 80% Äthanol, 10 min bei Raumtemperatur). Auf diese Weise sollen O-Acylgruppen am Sialinsäurerest ($C_4$-resp.$C_7$-$C_9$) , welche die Wirkung von Neuraminidase teilweise oder vollständig hemmen, durch Verseifungsreaktion abgespalten werden

(Lev und Spicer 1965; Culling et al. 1971, 1974; Sorvari und Stoward 1972; Culling 1974; Klessen 1977, 1978).

## 2.5. Säure-Behandlung der Schnitte

Da die ketosidische Bindung zwischen Sialinsäure und den anderen Zuckerresten säurelabil ist, wurden die Schnitte zur Abspaltung von Sialinsäure statt mit Neuraminidase mit methanolischer HCL behandelt (1. 1% HCl in Methanol; 2. 100 ml Methanol mit 0,4 ml 37% HCl, jeweils 2 Std. bei 37°C; Kantor und Schubert 1957, modifiziert; Culling 1974; Reid et al. 1974).

## 2.6. Perjodsäureoxidation der Schnitte

Um Aufschluß darüber zu erhalten, inwieweit die Polyhydroxylseitenkette ($C_7$-$C_9$) der Sialinsäurereste acyliert vorliegt, wurden die Schnitte einer "milden"Oxidation mit Perjodsäure unterzogen (Weber et al. 1975; Roberts 1977; Veh et al. 1979; Culling und Reid 1982). Anschließend wurden die Schnitte mit Neuraminidase behandelt, wobei die oxidierten, veränderten Sialinsäurereste nicht abgespalten werden (s.Diskussion). Die Perjodsäure wurde unter folgenden Bedingungen verwendet: 1 mM wässriger Perjodsäure, 15 min bei Raumtemperatur. Zum Vergleich wurde ein Teil der Schnitte der sonst üblichen Form der Perjodsäureoxidation - 44 mM, 15 min, Raumtemperatur - unterzogen.

In Zusammenhang mit den aufgeführten Techniken wurden Serienschnitte wie folgt behandelt (vgl. Schulte und Spicer 1985):

1. Lektin
2. Neuraminidase - Lektin
3. KOH-Neuraminidase - Lektin
4. KOH - Lektin
5. Methanolische HCl - Lektin
6. Perjodsäure (1 mM bzw. 44 mM) -Neuraminidase - Lektin
7. Neuraminidase-Perjodsäure - Lektin
8. Perjodsäure - Lektin

## 2.7. Immuncytochemische Methoden

Die immuncytochemischen Untersuchungen wurden mit Antikörpern gegen humanes FSH, LH und TSH entsprechend der Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Technik nach Sternberger (1979) durchgeführt (vgl. Abb.5). Die Antikörper wurden uns freundlicherweise von Dr.S.Raiti - National Pituitary Agency, National Institute of Health, Baltimore, MD, USA zur Verfügung gestellt.
Mit dem Fixierungsgemisch nach Bouin (Pikrinsäure-Formol-Eisessig s.o.) fixierte Serienschnitte wurden auf Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen, entparaffiniert und über die absteigende Alkoholreihe in Aqua demin. gebracht.

1. Einstellen der Schnitte für 30 min in 0,3% $H_2O_2$ in PBS zur Umsetzung endogener Peroxidase
2. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS. Eintrocknen der Schnitte unbedingt vermeiden.
3. Dekomplementieren des normalen Schafserums 30 min bei 56°C
4. Auftropfen von normalem Schafserum auf die Schnitte, Verdünnung 1:30 Einwirkungszeit 10 min
5. Normales Schafserum abtropfen lassen
6. Auftropfen des 1. Antikörpers (Kaninchen) auf die Schnitte. Einwirkungszeit: über Nacht bei +4°C. - Verdünnung (mit PBS): Anti-β-FSH 1: 1000 , Anti-β-LH 1: 4 000, Anti-β-TSH 1: 2 500
7. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS
8. Auftropfen des 2. Antikörpers (Schaf-Anti-Kaninchen-IgG ).Einwirkungszeit 45 min.
9. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS
10. Auftropfen des Kaninchen-Peroxidase-Antiperoxidase Komplexes (PAP) Einwirkungszeit 45 min; Verdünnung (mit PBS) 1:30
11. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS
12. Peroxidase-Nachweis mit Diaminobenzidin-$H_2O_2$ (Graham und Karnovsky, 1966) unter mikroskopischer Kontrolle
13. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS
14. Einstellen der Schnitte in 1% Osmiumtetroxid für 3-5 min, spülen der Schnitte in Aqua demin., entwässern und über Xylol eindecken in DePeX.

## 2.8. Kombination lektinhistochemischer und immuncytochemischer Methoden

Um antikörperbindende und lektinbindende Zellen am selben Gewebsschnitt darzustellen, wurden die folgenden beiden Reihenfolgen eingesetzt:

I.

1. Gewebsschnitte werden über Nacht mit Neuraminidase behandelt; anschließend werden sie mit biotinylierten Lektinen inkubiert, Schritt 1-8 der lektinhistochemischen Technik ( s.Seite 7 )
2. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS
3. Behandlung der Schnitte gemäß dem Verfahren nach Tramu et al. (1978, modifiziert): Einstellen der Schnitte in eine aus schwefelsaurem Kaliumpermanganat bestehende Oxidationslösung (1 ml $KMnO_4$ 2,5%, 1 ml $H_2SO_4$ 5%, 140 ml Aqua demin.) 5-20 sec unter mikroskopischer Kontrolle; anschließend werden die Schnitte kurz in Aqua demin. gespült.
4. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS
5. Auftragen des 1. Antikörpers auf die Schnitte entsprechend Schritt 6 der immuncytochemischen Technik (s. Seite 11)
6. - 11. Durchführung der weiteren Antigen-Antikörper-Reaktion entsprechend den Schritten 6 - 11 der immuncytochemischen Technik (s.Seite 11)
12. Peroxidase-Nachweis mit 4'-Cl-1'-Naphthol-$H_2O_2$
13. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS
14. Stabilisieren des Farbkomplexes durch Auftropfen von 1% Osmiumsäure auf die Schnitte für 3 min
15. 3x5 min spülen in PBS
16. Eindecken der Schnitte in Kaisers Glycerin-Gelatine

II.

1. Antigen-Antikörper-Reaktion gemäß der PAP-Methode entsprechend Schritt 1-13 der immuncytochemischen Technik (s. Seite 11)
2. Behandlung der Schnitte mit schwefelsaurem Kaliumpermanganat (s.Schritt I.3.)
3. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS
4. Inkubation der Schnitte mit biotinylierten Lektinen entsprechend Schritt 2-8 der lektinhistochemischen Technik (s. Seite 7)
5. Peroxidase-Nachweis mit 4'-Cl-1'-Naphthol-$H_2O_2$
6. 3x5 min spülen der Schnitte in PBS

7. Stabilisieren des Farbkomplexes durch Einstellen der Schnitte für 3 min in 1% Osmiumsäure
8. 3x5 min spülen in PBS
9. Eindecken der Schnitte in Kaisers Glycerin-Gelatine

Im einzelnen wurden folgende Reaktionssequenzen durchgeführt:

1. Neuraminidase - Lektin - Antikörper
2. Acetatpuffer - Lektin - Antikörper
3. Lektin - Antikörper
4. Neuraminidase - Lektin

## 3.0. B E F U N D E

### 3.1. Fixierungsgemische

In Vorversuchen wurde ermittelt, welches Fixierungsgemisch gleichermaßen sowohl für die lektinhistochemischen als auch für die immuncytochemischen Untersuchungstechniken geeignet ist. Dabei zeigte sich, daß die Fixierungen mit dem Carnoy-Gemisch sowie die mit gepuffertem Neutralformol bei Anwendung der lektinhistochemischen Techniken zu durchgehend negativen Resultaten führt.Eine zu starke Hintergrundreaktion war nach der Fixierung mit dem Gemisch nach Elftman zu verzeichnen. Gute Ergebnisse wurden bei lektinhistochemischen und immuncytochemischen Untersuchungen mit dem Bouin-Gemisch erzielt, das daraufhin bei allen weiteren Versuchen eingesetzt wurde.

### 3.2. Ergebnisse der lektinhistochemischen Untersuchungen

Die Zellen der Adenohypophyse der Ratte reagieren in unterschiedlicher Intensität mit den verwendeten Lektinen. Die Ergebnisse der lektinhistochemischen Verfahren sind in Tab.2,S.19 zusammmengestellt. Mit lektinhistochemischen Methoden allein sind Aussagen über den funktionellen Charakter verschiedener HVL-Zellen nicht möglich, da mit ihnen der Proteinanteil der Hormone nicht miterfaßt wird. Die Angaben in Tab.2 beziehen sich deshalb auf die Gesamtheit der HVL-Zellen.

Arachea hypogaea Aggl. (PNA)

Das ß-D-Gal-(1-3)-D-GalNAc und ß-D-Gal erkennende Lektin reagiert im allgemeinen sehr schwach bis negativ mit den Zellen des HVL. Selten sind Blutgefäßendothelien und/oder Gefäßbindegewebe der Sinuswände und andeutungsweise paranukleäre Bezirke einzelner Zellen markiert.

Pisum sativum Aggl. (PSA)

Dieses Lektin gilt als spezifisch für ∝-D-Mannose. Meist sind nur schwach angefärbte runde, ovale und ausgesprochen polygonal zipflige Zellen bei relativ intensiv gefärbtem Hintergrund zu erkennen (Abb.11). Gelegentlich sind paranukleäre Areale markiert. Die Zellen des Mittel-

lappens reagieren homogen mit PSA. Zusätzlich fallen sekrethaltige Auftreibungen vermutlich axonaler Strukturen im Hinterlappen (Herring-Körper) auf.

Soy Bean Aggl. (SBA)

Das für α-D-GalNAc spezifische Lektin markiert gelegentlich äußerst schwach Blutgefäßwände. Cytoplasmatische Reaktionen in vereinzelten HVL-Zellen sind andeutungsweise wahrzunehmen (Abb.12)

Wheat Germ Aggl. (WGA)

Das für Sialinsäure und β-D-GlcNAc spezifische Lektin reagiert schwach mit fast allen Zellen, aus denen sich diffus verteilt einige runde und ovale Zellen hervorheben. Gelegentlich sind Blutgefäßwände zu erkennen.

Succinyliertes WGA (S-WGA)

Das für β-D-GlcNAc spezifische Lektin reagiert bei mäßiger bis starker Hintergrundfärbung sehr intensiv mit runden, polygonalen, besonders sternförmigen Zellen, deren lange cytoplasmatischen Fortsätze Kontakt mit Blutgefäßen aufnehmen und dabei andere Zellen umschließen (Kohabitation, Abb. 14). Im medioanterioren Bereich an der Grenze zwischen Vorder- und Mittellappen ist eine Konzentration vornehmlich runder Zellen zu beobachten. Es findet dort offensichtlich keine Kohabitation mit polygonalen Zellen statt (Abb.15).

Dolichos biflorus Aggl. (DBA)

Das α-D-GalNAc-spezifische Lektin markiert die paranukleären Regionen der meisten HVL-Zellen. Diese käppchenförmigen Areale fallen oftmals durch ihre Blutgefäß-abgewandte Lage auf (Abb. 17a,b). Vereinzelt wurden auch cytoplasmatische Reaktionen runder und ovaler Zellen beobachtet. An einigen Schnitten fehlt die zelluläre Reaktion; dafür fallen positiv reagierende Blutgefäßwände auf.

Ulex Europaeus I Aggl. (UEA I)

Ein ähnliches Reaktionsmuster bietet das für α-L-Fucose spezifische UEA I. Sehr deutlich treten die an fast allen Zellen nachweisbaren käppchenförmigen paranukleären Areale hervor (Abb. 19). Auch hier

ist die oben beschriebene Käppchenpolarität zu beobachten. Vereinzelt finden sich cytoplasmatische Reaktionen meist runder Zellen, die im medioanterioren Bereich gehäuft vorkommen. Ebenso wie die Zellen des Hypophysenvorderlappens lassen sich im Mittellappen diskrete paranukleäre Zonen, allerdings bei völligem Fehlen cytoplasmatischer Reaktionen, nachweisen. Das Neuropil des Hypophysenhinterlappens ist schwach und diffus gefärbt.

### 3.3. Neuraminidase-Vorbehandlung der Schnitte

Ein Vergleich verschiedener Neuraminidase-Verdünnungen (0,5 U/ml, 0,33 U/ml) ergab auch bei längerdauernder Inkubation (15 Std.) keinen Unterschied im Reaktionsausfall.

#### Neuraminidase - PNA

Nach Neuraminidase-Vorbehandlung reagieren unterschiedlich große runde und ovale Zellen stark positiv (Abb. 21 a,b).Es fällt auf, daß diese Zellen in medioanterioren Arealen in der Nähe zum Mittellappen konzentriert sind. Gelegentlich sind in diesen Zellen Vakuolen erkennbar. Die Zellen des Mittellappens sind homogen gefärbt, ebenso das Neuropil des Hinterlappens.

#### Neuraminidase - PSA

Die enzymatische Abspaltung von Sialinsäure führt in den meisten Fällen zu keiner auffälligen Veränderung von Reaktionsmuster und -stärke gegenüber den nicht mit Neuraminidase behandelten Schnitten.

#### Neuraminidase - SBA

Gegenüber einer fast negativen Reaktion bei alleiniger Lektin-Inkubation erscheinen nach Neuraminidase-Vorbehandlung zahlreiche, über den gesamten HVL verteilte, intensiv gefärbte Zellen bei nur schwacher Anfärbung des Hintergrundes (Abb. 13). Es fallen neben rundlichen, hauptsächlich im medioanterioren Bereich gelegenen Zellen, auch spindelförmige mit zipfligen cytoplasmatischen Fortsätzen versehene Zellen auf, die andere, negativ reagierende Zellen umschließen (Abb.13).

Neuraminidase - WGA

Nach enzymatischer Vorbehandlung der Schnitte ist nur eine diskrete Abschwächung positiv reagierender Zellen feststellbar.

Neuraminidase - S-WGA

Gegenüber den nicht mit Neuraminidase behandelten Schnitten ist hier keine Änderung des Reaktionsmusters festzustellen: Die meisten Zellen zeigen eine schwache Reaktion, von denen sich einzelne Zellen unterschiedlicher Größe und Form (rund bis extrem polygonal) intensiv angefärbt hervorheben (Abb. 16). Die Zellen des Mittellappens reagieren homogen stark positiv, ebenso wie das Neuropil mit Herring-Körpern im Hinterlappen.

Neuraminidase - DBA

Die paranukleären Reaktionen treten hier zugunsten ungleichmäßig verteilter, mäßig bis stark angefärbter runder Zellen zurück (Abb. 18), die gehäuft medial und anterior an der Grenze zum Mittellappen auftreten. Allgemein dominieren große und kleine runde bis ovale Zellen in zentralen Abschnitten des HVL. Polygonale Zellen sind praktisch nicht nachweisbar.

Neuraminidase - UEA I

Hier gilt der auch für Neuraminidase - DBA beschriebene Reaktionstyp: die paranukleär markierten Areale treten etwas zurück, dafür häufen sich hauptsächlich runde Zellen unterschiedlicher Größe, vorzugsweise in der medioanterioren Zone. Polygonale Zellen sind kaum vorhanden. In einzelnen Zellen ist eine dichte Granulierung festzustellen (Abb. 20). Die Reaktionen von Zellen des Mittellappens sowie des Neuropils des Hinterlappens fallen negativ aus.

## 3.4. Kontrollen

Gelegentlich führt auch die Inkubation mit enzymfreier Acetatpufferlösung bei pH 5,5 zu ähnlichen Reaktionsformen wie nach Vorbehandlung mit Neuraminidase-Acetatpuffer. Jedoch ist die Intensität deutlich geringer, so daß von einer signifikanten und spezifischen Neuraminidase-

Wirkung gesprochen werden kann.

### 3.5. Alkali-Behandlung der Schnitte

Während nach Einwirkung von Neuraminidase im allgemeinen eine erhöhte Bindungsreaktivität für Lektine zu beobachten war, wirkte sich eine der Neuraminidase-Inkubation vorausgehende Behandlung mit äthanolischer KOH nicht reaktionsverstärkend aus: Hier wurden im allgemeinen keine Veränderungen in der Färbeintensität beobachtet. Lediglich mit KOH/Neuraminidase/UEA I war andeutungsweise eine Abschwächung der Reaktion im medioanterioren Bereich wahrzunehmen. Der Vergleich zwischen Lektinreaktion allein einerseits und der KOH/Lektin-Sequenz andererseits zeigte mit Ausnahme einer geringfügigen Abschwächung im Falle der Sequenz KOH/WGA keine Unterschiede (vgl. Tab.2, S.19).

### 3.6. Perjodsäureoxidation der Schnitte

Nach 15 minütiger Oxidation mit 1 mM Perjodsäure (Sequenz: Perjodsäure/Neuraminidase/Lektin) wurden für alle Lektine eine stark abgeschwächte bis negative, nach 44 mM (=1%) Perjodsäure-Vorbehandlung immer negative Reaktionen beobachtet. Die Sequenz Neuraminidase/Perjodsäure/Lektin, ausgeführt für die Lektine PNA und DBA, führte zu einer stärkeren Anfärbung als die Sequenz Perjodsäure/Neuraminidase/Lektin. Reaktionen in der Reihenfolge Perjodsäure/Lektin fielen negativ aus (vgl. Tab.2).

### 3.7. Säure-Behandlung der Schnitte

Nach Vorbehandlung mit methanolischer HCl-Lösung fällt eine allgemeine Abschwächung der Reaktion für Lektine auf. Ausnahmen bilden lediglich die Sequenzen HCl/PNA und HCl/S-WGA. Das vorher auffallende Hervortreten einzelner Zellen aus dem Verband der HVL-Zellen ist allerdings nach HCl-Vorbehandlung nirgends mehr zu beobachten (vgl. Tab.2)

### 3.8. Kontrollen

Im Vergleich zu nicht vorbehandelten Schnitten zeigten Gewebsschnitte, welche zuvor mit dem Avidin-Biotin-Blocking Kit inkubiert wurden, keine

| METHODE | PNA | PSA | SBA | WGA | S-WGA | DBA | UEA I |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lektin | 0-1 | 1-2 | 0 | 1 | 1-3 | 2* | 2* |
| Neuraminidase | 2-4 | 1-2 | 2-4 | 1 | 1-3 | 2-4 | 2-4 |
| KOH-Neuraminidase-Lektin | 2-4 | 1-2 | 2-4 | 1 | 1-3 | 2-4 | 2-3 |
| KOH-Lektin | 0-1* | 1-2 | 0 | 0-1 | 1-3 | 2* | 2* |
| HCl-Lektin | 1 | 1 | 0-1 | 0-1 | 1-3 | 1 | 1 |
| Perjodsäure 1mM - Neuraminidase-Lektin | 0-1 | 0-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Perjodsäure 44mM -Neuraminidase-Lektin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Neuraminidase-Perjodsäure 1mM -Lektin | 2 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 1 | n.d. |
| Perjodsäure 1 mM -Lektin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabelle 2: Relative Reaktionsstärken der verwendeten Lektine bei verschiedenen Prozeduren.

0= keine Reaktion, 4= maximale Reaktion

*= Golgi-Felder, n.d.=nicht durchgeführt

Verminderung der Reaktionsintensität. Es kann also davon ausgegangen werden, daß in der Hypophyse der Ratte keine nennenswerten Mengen endogenen Avidins resp. Biotins vorliegen.

Die Bindung der Lektine UEA I, DBA, PSA, S-WGA an die entsprechenden Zuckerreste im Schnitt wurde nicht regelmäßig durch Präinkubation mit ihren spezifischen Zuckern in vitro verhindert.

Ansätze ohne Lektin sowie ohne ABC-Kit zeigten negative Resultate.

## 3.9. Ergebnisse der immuncytochemischen Untersuchungen

### 3.9.1. Thyrotrope Zellen

Die mit Anti-ß-TSH markierten Zellen, die diffus im Vorderlappen verteilt sind, liegen als kleine und große runde und polygonale Zellen, oft in Gruppen an Blutgefäßen angeordnet, aber auch als ausgesprochen spindelförmige Zellen vor. Gelegentlich erscheinen sternförmige, mit langen Ausläufern versehene Zelleiber, die andere, nicht markierte Zellen einzuschließen scheinen (Abb. 22 a,b).

### 3.9.2. Gonadotrope Zellen (FSH und LH)

Die gonadotropen Zellen erscheinen als große und kleine runde Zellen. Sie kommen überall in der Adenohypophyse vor, konzentrieren sich aber im Gegensatz zu den TSH-Zellen im medioanterioren Bereich. Auch sie bevorzugen die Nähe zu Blutgefäßen, fallen aber durch einen geringen Anteil spindelförmiger Zellen auf (Abb. 23 und 24a,b). Ein geringer Anteil gonadotroper Zellen reagiert zugleich mit Anti-ß-TSH.

## 3.10. Ergebnisse der kombinierten lektinhistochemischen und immuncytochemischen Untersuchungen

### 3.10.1. Neuraminidase/Lektine und Anti-ß-LH

Neuraminidase/PNA/Anti-ß-LH

Die sehr stark ausfallende Lektinreaktion überwiegt. LH-Zellen, die keine PNA-spezifischen Zuckerreste enthielten ("reine" LH-Zellen), ließen sich nicht nachweisen. Mischformen sind von "reinen"PNA-Zellen nicht zu unterscheiden (Abb.26). Im Gegensatz dazu ließen Gewebsschnitte ohne Neuraminidase-Vorbehandlung nach PNA- und LH-Inkubation erwartungsgemäß einen hohen Anteil "reiner" LH-produzierenden Zellen erkennen (Abb.25).

Neuraminidase/UEA I/Anti-ß-LH

Es finden sich zu gleichen Teilen drei verschiedene Zellarten (Abb. 27):
- Zellen, welche nur LH produzieren
- Zellen, die allein Fucose, aber nicht LH enthalten
- Zellen, in welchen beide Substanzen nachweisbar sind

Die UEA-bindenden Zellen sind meist rund bis oval und konzentrieren sich ebenfalls medioanterior in Nachbarschaft zum Mittellappen.

Neuraminidase/DBA/Anti-ß-LH

Im Unterschied zur Neuraminidase/UEA/Anti-LH-Darstellung liegt dorsal ein relativ hoher Anteil "rein"LH-positiver Zellen; nach basal nimmt der Anteil der Mischformen und der rein DBA-markierten Zellen zu, die basal überwiegen. Auffällig ist weiterhin die Konzentration der DBA-positiven Zellen im medioanterioren Bereich (Abb.28).

Neuraminidase/SBA/Anti-ß-LH

Ebenso wie im dorsalen Abschnitt bei DBA/Anti-LH prägt das häufige Vorkommen "reiner" LH-Zellen das Bild. Die hellbraunen SBA-Zellen sind oft spindelförmig. Jedoch finden sich Mischformen genauso häufig wie allein LH-reaktive und allein SBA-reaktive Zellen (Abb. 29).

Neuraminidase/PSA/Anti-ß-LH

Runde und polygonale PSA-Zellen sowie Mischformen mit LH charakterisieren diese Kombination. "Reine" LH-Zellen kommen nicht vor. Eine Konzentration ist dorsal festzustellen.

Neuraminidase/S-WGA/Anti-ß-LH

Hier liegen nur wenige "reine"LH-Zellen vor. Es sind außerdem ein hell- bis mittelbraun gefärbter Zelltyp (rein S-WGA markierte Zelien) und ein gemischt gefärbter Zelltyp, der medioanterior fast ausschließlich vorliegt, zu beobachten.

Zusammenfassend ergibt sich aus den vorliegenden Befunden folgendes:

1. Die für GalNAc spezifischen Lektine (DBA, SBA ) weisen in ihrer Reaktion folgende Unterschiede auf: Viele LH-Zellen reagieren nicht mit GalNAc-spezifischem SBA. Bei DBA ist ein Gradient von dorsal nach basal zu beobachten: der größte Anteil nicht DBA-reaktiver LH-Zellen befindet sich dorsal.
2. Einige LH-Zellen reagieren nicht mit dem für Fucose spezifischen Lektin UEA I.
3. Viele LH-Zellen reagieren mit den für D-Gal, GlcNAc und Fuc- spezifischen Lektinen (PNA, S-WGA, UEA I).
4. Alle LH-Zellen reagieren mit dem für Mannose spezifischen Lektin PSA (Tab.3 , S.25).

LH-positive Zellen sind mithin hauptsächlich mit subterminaler Gal, sowie mit Man, GlcNAc und Fuc assoziiert. Neben Mischformen kommen auch hormonproduzierende Zellen ohne nachweisbare Zuckerreste vor.

3.10.2. Neuraminidase/Lektine und Anti-ß-FSH

Das Bild, welches bei Doppelinkubation mit Anti-ß-FSH und Lektinen (Neuraminidase/Lektin Sequenz) gewonnen wurde, ähnelt den unter 3.11.1. beschriebenen Resultaten sehr. Lediglich das für GlcNAc spezifische Lektin S-WGA läßt sich seltener in FSH-produzierenden Zellen nachweisen (Tab.3 , Abb.30).

### 3.10.3. Neuraminidase/Lektine und Anti-ß-TSH

Neuraminidase/PNA/Anti-ß-TSH

Die medioanterior konzentrierten TSH-produzierenden Zellen fallen durch einen geringeren Anteil an Gal auf, als dies bei gonadotropen Zellen der Fall ist.

Neuraminidase/UEA I/Anti-ß-TSH

Das Reaktionsergebnis ähnelt auffallend jenem, welches bei Doppelinkubation von UEA mit Anti-Gonadotropinen erzielt wurde (Abb.31).

Neuraminidase/DBA/Anti-ß-TSH

Noch deutlicher als nach Neuraminidase/PNA/Anti-TSH-Inkubation fällt hier der Anteil der TSH-Zellen auf, die nicht gleichzeitig für DBA zugängliches α-D-GalNAc enthalten. Jedoch ist der Reaktionsausfall für das Lektin in der medioanterioren Zone so stark, daß Mischformen nicht von allein mit DBA gefärbten Zellen unterschieden werden können.

Neuraminidase/SBA/Anti-ß-TSH

Die in vielfältiger Form vorliegenden GalNAc-enthaltenden Zellen wurden nur selten gleichzeitig mit Anti-ß-TSH markiert.

Neuraminidase/PSA/Anti-ß-TSH

Die Reaktion entspricht in etwa derjenigen, die nach Anti-FSH resp. Anti-LH/Lektin-Doppelfärbung zu beobachten war. TSH-Zellen ohne PSA-Rezeptoren sind nicht nachweisbar.

Neuraminidase/S-WGA/Anti-ß-TSH

Große und kleine runde, sowie polygonale Zellen enthalten S-WGA-positives Material. Dieses kann in TSH-positiven und TSH-negativen Zellen nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurden TSH-Zellen beobachtet, die sich Neuraminidase/S-WGA negativ verhielten.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes:

Die Lektin/Anti-ß-TSH-Kombinationen sind durch ein von der Lektin-Anti-Gonadotropin-Doppelfärbung abweichendes Reaktionsmuster gekennzeichnet. Das gleichzeitige Vorkommen von nachgewiesenen Zuckerresten und TSH in denselben Zellen beschränkt sich weitgehend auf Fucose (mit UEA I), Mannose (mit PSA) und ß-N-Acetyl-Glucosamin (mit S-WGA).

Bei letzt genannten Kombinationen liegen aber auch TSH-Zellen ohne positiven Zuckernachweis vor (sog."reine TSH-Zellen").

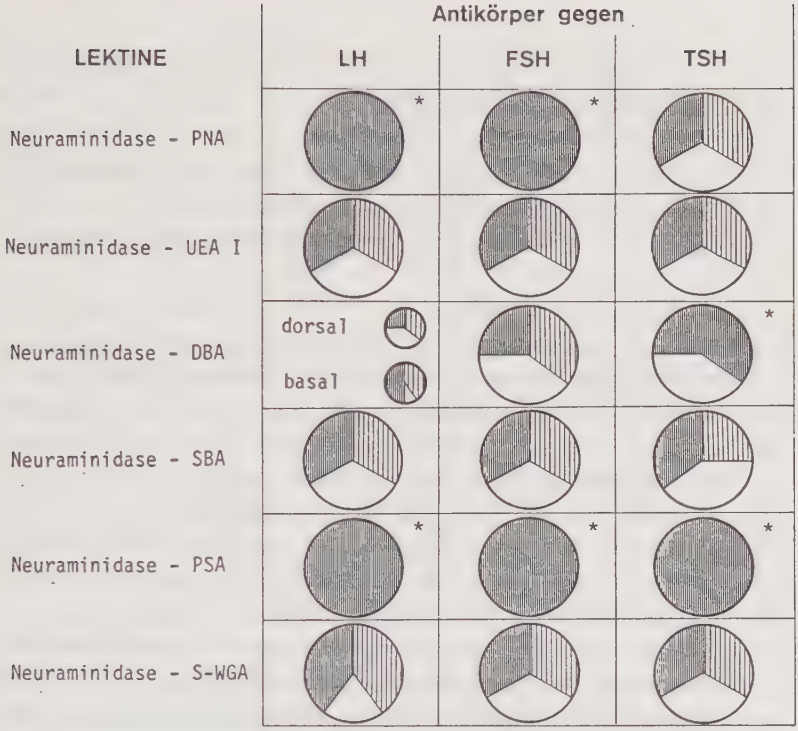



Tabelle 3: Kombination lektinhistochemischer und immuncytochemischer Methoden
Die Kreissektoren entsprechen den subjektiv geschätzten Anteilen der HVL-Zellen, die entweder Lektin oder Antikörper binden, bzw. Mischformen darstellen.
Beispiel: In Neuraminidase-SBA-Anti-LH behandelten Schnitten lassen sich zu etwa gleichen Teilen Zellen nachweisen, die SBA-spezifische Zucker (GlcNAc) oder nur LH enthalten, bzw. Mischformen darstellen. Der Anteil "freier" TSH-Zellen ist bei Kombination Neuraminidase-SBA-TSH etwas höher.

* Es kann mikroskopisch kein Unterschied zwischen Zellen festgestellt werden, die nur Lektin bzw. Lektin und Antikörper (Mischformen) binden.

Geschätzter Anteil der Zellen,

- die nur Lektin
- die Lektin und Antikörper
- die nur Antikörper binden

# 4. D I S K U S S I O N

## 4.1. Allgemeine Vorbemerkung

Für das Verständnis der histochemischen Reaktionen, die zur Darstellung der Zellen des Hypophysenvorderlappens verwendet werden, ist es sinnvoll, kurz auf die chemische Struktur der dort produzierten Hormone einzugehen.

Die in der Literatur nachweisbaren biochemischen Angaben beziehen sich überwiegend auf die Hypophyse höherer Spezies, während Informationen über Struktur und andere biochemische Parameter der entsprechenden Hormone bei Nagern - vermutlich aus Materialmangel - nur spärlich vorhanden sind. Gleichwohl kann man davon ausgehen, daß die funktionell gleichen Hormone bei verschiedenen Spezies im Proteinanteil zumindest sehr ähnlich aufgebaut sind, wie aus Ergebnissen immuncytochemischer Untersuchungen an der Hypophyse der Ratte hevorgeht, bei denen Antikörper gegen TSH, FSH und LH von Rind, Schwein oder Mensch verwendet wurden. Dennoch zeigten sowohl individuelle Unterschiede im Aufbau variabler Hormonabschnitte, wie sie die Kohlenhydratketten darstellen, als auch speziesabhängige Differenzen, daß Gleichsetzungen und Folgerungen von einer Spezies auf die andere nur mit Vorbehalt vorgenommen werden sollten.

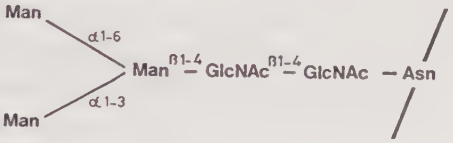
## 4.2. Struktur der Glykoproteinhormone

Die adenohypophysären Glykoproteinhormone FSH, LH und TSH sowie das plazentare Choriongonadotropin bestehen aus zwei Proteinketten, einer α- und einer ß-Untereinheit, welche nicht kovalent miteinander verbunden sind. Die ß- Untereinheiten determinieren die Spezifität des Hormons, während die α- Untereinheiten der verschiedenen Hormone einer Spezies weitgehend identisch und untereinander austauschbar sind (Pierce 1974; Sairam und Papkoff 1974). An jeder Proteinkette der hypophysären Glykoproteine befinden sich N-glykosidisch über Asparagin (Asn) verknüpft eine (ß-Untereinheit) bzw. zwei (α-Untereinheit) Kohlenhydratketten (Abb.2). Lediglich FSH besitzt auch an seiner ß-Untereinheit zwei Kohlenhydratsequenzen (Shome und Parlow 1974).

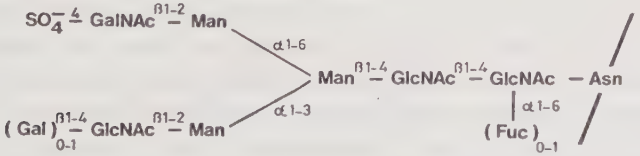
Die Kohlenhydratketten bestehen aus Hexosen (Mannose, Galactose, Fucose), Hexosaminen (Glucosamin, Galactosamin) und Sialinsäure (Strukturformeln s.Abb. 3 und 8). Fucose und Sialinsäure befinden sich jeweils in terminaler Stellung.

### 4.2.1. Aufbau der Kohlenhydratketten

Die stufenweise Glykosylierung findet weitgehend am Golgiapparat statt. Dort wird im Rahmen eines recht genau untersuchten Vorganges (Schachter und Roseman 1980) die bei allen Asn-N-glykosidisch mit der Peptidkette verbundenen Kohlenhydraten identische Oligosaccharidkernstruktur synthetisiert:




Im weiteren Verlauf entstehen auf den Mannose-Resten verschiedene Polymannosyl-Äste ("high mannose type"), die durch Glykosyltransferasen während der terminalen Glykosylierung wieder abgespalten werden (Abb.4). Dieser Schritt soll unmittelbar vor der Sekretion stattfinden (Chin und Habener 1981). Sialinsäure als terminaler Glykosylrest erscheint in nennenswerten Mengen nur an den Kohlenhydratketten des FSH aller untersuchten Spezies und des TSH vom Menschen (Sairam und Papkoff 1974; Pierce 1974). Im LH der Ratte wurde keine Sialinsäure gefunden (Ward et al. 1970). Bedi et al. (1981) schlugen für die drei Asn - verknüpften Kohlenhydratketten des LH vom Schaf folgende Struktur vor:




Hierbei ist die an $C_4$ des GalNAc - Restes substituierte Sulfonsäuregruppe bemerkenswert. Gal und Fuc sind nicht regelmäßig vorhanden.

## 4.3. Identifizierung der Zellen des HVL aufgrund histologisch-histochemischer Kriterien

Während über Jahrzehnte in der Hypophysenhistologie die Trichromfärbungen (z.B. Azan, Goldner, Mallory) dominierten und man den Zellen je nach Annahme des jeweiligen Farbstoffes die klassischen Bezeichnungen "acidophil", "basophil" und "chromophob" gab, standen ab 1946 zunehmend kohlenhydratspezifische Reaktionen im Vordergrund.

### 4.3.1. Nachweis neutraler Kohlenhydratreste

Hierzu zählt vor allem die Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion (PAS; McManus 1946). Der Mechanismus der PAS-Reaktion beruht auf der Oxidation vicinaler OH-Gruppen (1,2-Glykole) unter Spaltung der -C-C-Bindung in neutralen Kohlenhydratbausteinen. Die entstandenen Aldehyde werden dann in einem zweiten Reaktionsschritt mit Schiff'schem Reagens (Leukofuchsin) sichtbar gemacht.

Die PAS-Reaktion hat sich als wertvolles Instrument hinsichtlich der Unterscheidung bestimmter HVL-Zellen erwiesen. Von Pearse (1952) ist die Bezeichnung "Mucoidzellen" für alle PAS-positiven Zellen des HVL vorgeschlagen worden, wobei sich gezeigt hat, daß diese den "basophilen" unter Einschluß eines Teiles der "chromophoben" Zellen klassischer Nomenklatur entsprechen.

Es hat an Versuchen nicht gefehlt, aufgrund der PAS-Reaktion sowie zusätzlicher morphologischer Kriterien die auf diese Weise dargestellten Glykoproteine im Sinne einer funktionellen Charakterisierung näher zu typisieren d.h. zum Beispiel zwischen den gonadotropen und thyrotropen Zellen (Purves und Griesbach 1951) oder innerhalb der Gruppe der gonadotropen Zellen zwischen FSH-und LH-Zellen zu differenzieren (Purves und Griesbach 1954, 1955). Dennoch konnte auf diese Weise eine eindeutige Zuordnung der Hormonbildung zu morphologisch unterschiedlichen Zelltypen nur in beschränktem Ausmaß erfolgen.

4.3.2. Nachweis saurer resp. basophiler Kohlenhydratreste

Der Nachweis stark anionischer Gruppen im histologischen Schnitt kann mit kationischen Farbstoffen (z.B. Alcianblau) oder positiv geladenem kolloidalem Eisen erfolgen. Während aus Gründen der geringen Empfindlichkeit eine Reaktion der Adenohypophyse mit Alcianblau nur eine schwache Färbung hervorruft (Klessen 1973), erweist sich die Reaktion mit kolloidalem Eisen als wesentlich sensitiver. Schon die Präsenz weniger eisenadsorbierender Teilchen führt zu einer maximalen Reaktion (Arnold 1971). Die von Hale (1946) entwickelte Eisenbindungsreaktion beruht auf der Bindung von kolloidalem Eisen an primär vorhandene oder durch spezifische Vorbehandlung der Gewebsschnitte sekundär erzeugte saure Gruppen bei niedrigem pH-Wert. Das gebundene Eisen wird anschließend in einem zweiten Schritt mit einer salzsauren Kaliumferrocyanidlösung als Berliner Blau dargestellt.

Die Zellen des HVL resp. die von den entsprechenden Zellen produzierten Glykoproteine besitzen zwei Angriffspunkte für kolloidales Eisen:
1. In der Kohlenhydratkette liegen an terminaler Stellung Sialinsäuren, deren dissoziierte Carboxylgruppen bei niedrigem pH kolloidale Eisenpartikel zu adsorbieren vermögen.
2. Im LH des Schafes wurden an terminaler Stellung Sulfonsäuregruppen nachgewiesen (Parsons und Pierce 1980; Bedi et al. 1982), die ebenfalls kolloidales Eisen binden können. Parsons und Pierce (1980) halten es für möglich, daß Sulfatgruppen auch Kohlenhydratketten anderer Glykoproteinhormone terminieren können.

4.3.3. Immuncytochemische Methoden

Der Einsatz von fluoreszenz- oder enzymgekoppelten Antikörpern, die gegen gereinigte HVL-Hormone gerichtet sind, erlaubt eine Zuordnung dieser Hormone zu bestimmten Zelltypen (Übersicht bei Girod 1983). Dies führte zu einer neuen funktionellen Nomenklatur, wobei die Zelltypen nach dem sezernierten Hormon oder dem stimulierten Zielorgan benannt wurden, z.B. Gonadotrope, Thyrotrope oder Corticotrope Zellen.

Die einfachste immuncytochemische Technik ist die von Coons und Kaplan 1941 entwickelte und 1950 weiter verbesserte direkte Methode, bei der der Marker, ein Fluoreszenzfarbstoff, direkt an den Antikörper des zu suchenden Antigens gebunden ist. Bei der indirekten Methode wird zunächst ein unmarkierter erster Antikörper verwendet, auf den in einem zweiten Reaktionsschritt ein zweiter markierter Antikörper einer anderen Spezies, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, aufgebracht wird. Später wurden anstelle der Fluorochrome Enzyme verwendet, z.B. Peroxidase, alkalische Phosphatase, Glucoseoxidase, die mit einem geeigneten Medium in Gegenwart des entsprechenden Substrates entwickelt werden können.

Eine Weiterentwicklung stellt die sog. "Unmarkierte Antikörper Peroxidase-Antiperoxidase" (PAP) - Methode dar (Sternberger 1970). Hier fungiert der zweite Antikörper mit seiner freien Antigenbindungsstelle als eine unmarkierte Brücke für den von Sternberger 1979 entwickelten Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Komplex. Dieser besteht aus drei Peroxidase- und zwei Antiperoxidasemolekülen, die eine nicht kovalente Bindung mit dem Brückenantikörper eingehen können. Die Reaktion wird anschließend mit $H_2O_2$ in Gegenwart eines geeigneten Elektronenspenders, z.B. 3'-3'- Diaminobenzidin (DAB) entwickelt (Abb.5).

### 4.3.4. Lektinhistochemische Methoden

Die Anwendung klassischer kohlenhydrathistochemischer Methoden erlaubt zwar eine Klassifizierung bestimmter Kohlenhydrate in z.B. neutrale oder saure Mucosubstanzen oder eine Differenzierung zwischen sulfathaltigen Gruppen und Carboxylresten, sie gestattet jedoch mit der Ausnahme von Glykogen und Sialinsäure nicht die spezifische Identifizierung individueller Kohlenhydratbausteine (Pearse 1972).

Dieses ist mit Hilfe spezifischer Lektine möglich. Die Glykoproteinhormonproduzierenden Zellen des HVL können so zusätzlich zu den bisherigen Methoden der Kohlenhydrathistochemie entsprechend den in ihnen nachweisbaren spezifischen Zuckerresten charakterisiert werden. Dennoch ist bei der Identifizierung von HVL-Hormonen allein mit histochemischen Methoden Vorsicht angebracht, da viele Glykoproteine in Hypophysenextrak

ten vorhanden sind, die keine bekannte hormonelle Aktivität besitzen, aber ähnliche histochemische Eigenschaften aufweisen (Pierce et al. 1975).

4.3.4.1.Historischer Oberblick

Die Eigenschaft des Pflanzenextraktes aus Ricinus comm. Ricin, Erythrozyten zu agglutinieren, wurde schon 1888 von Stillmark erkannt (Übersicht bei Sharon und Lis 1972). Die Toxizität dieses und ähnlicher Pflanzenextrakte führte zu dem Namen "Phytotoxin". Nach der Entdeckung auch ungiftiger Agglutinine (aus Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Lens culinaris und Vicia sativa) wurde der Begriff "Phythämagglutinin" gebräuchlich (Landsteiner und Raubitschek 1907). Der Name Lektin (von lat. legere = lesen, auswählen) wurde 1954 von Boyd eingeführt, nachdem eine Reihe blutgruppenspezifischer Extrakte isoliert worden war. Er trug damit zunächst dem Phänomen der "Auswahl" bestimmter blutgruppenspezifischer Determinanten durch pflanzliche Extrakte Rechnung. Johnson (1964) beschrieb das erste blutgruppenspezifische Hämagglutinin nicht pflanzlicher Herkunft: ein Anti-$A_1$-Glykoprotein in der Hämolymphe der Venusmuschel Saxidonus giganteus. Die Hämagglutination konnte mit N-Acetyl-Galactosamin inhibiert werden. Sharon und Lis (1972, 1977) isolierten weitere tierische Agglutinine und reihten sie unter den Begriff "Lektin" ein, wobei sie die regelmäßige Präsenz von Kohlenhydraten als Lektinrezeptoren hervorhoben. Es wurden jedoch auch Agglutinine gefunden, für die bisher keine inhibitorischen Mono- oder Oligosaccharide nachgewiesen werden konnten (Sage und Connett 1969; Balding et al. 1973; Balding 1979). Aus diesem Grunde wurde anstelle der eingrenzenden Zucker - spezifischen Natur der Lektine der Begriff der Rezeptor-Spezifität vorgeschlagen (Gold und Phelps 1972). Das Konzept der Zuckerspezifität steht jedoch heute im Vordergrund.

4.3.4.2.Definition und Eigenschaften eines Lektins

Gleichwohl ist die Definition eines Lektins nicht einheitlich. Goldstein et al. (1980) definieren sie als zuckerbindende Proteine oder Glykoproteine nicht immunologischen Ursprungs, die Zellen zu agglutinieren und/oder Glykokonjugate mit entsprechenden Lektin-bindenden Sacchariden zu

präzipitieren vermögen. Diese Definition bezieht auch Kohlenhydrat-spezifische Enzyme, Transportproteine und Toxine ein.

Demgegenüber treten Kocourek und Hořejši (1981, 1983) dafür ein, die Fähigkeit der Lektine zur Zellagglutination aus der Definition auszuklammern, weil es sich dabei um ein komplexes Phänomen handele, das von Proteineigenschaften, den jeweiligen Zellen und dem verwendeten Milieu abhängig sei. Weiterhin repräsentiere die Zellagglutination nicht die wahre physiologische Aktivität der Lektine. Die Einbeziehung von kohlenhydratspezifischen Enzymen und Transportproteinen, die verschiedene Proteingruppen mit spezialisierten Funktionen konstituieren, könnte zur Verwirrung führen.

Die Definition Kocoureks lautet somit: "Lektine sind Proteine oder Glykoproteine, die auf nicht-immunologischer Basis spezifische und reversible Bindungen mit niedermolekularen Zuckern ohne Änderung der kovalenten Struktur der erkannten Glykosyl-Liganden eingehen können" (Kocourek 1983, vgl. Abb.10).

Lektine wurden aus den verschiedensten Organismen isoliert (Pflanzen, Bakterien, Pilze, Invertebraten, Vertebraten). Sie variieren in ihrem Molekulargewicht von 11.000 ( Blutgruppe B spezifisches Lektin des Bakteriums Streptomyces sp.) bis 335.000 (Sialinsäurespezifisches Lektin aus Limulus Polyphemus, LPA). Die Zucker-Lektinbindung ist schwächer als eine immunologische Bindung: Die Assoziationskonstanten von Lektinen für Zucker liegen ein bis zwei Größenordnungen niedriger als diejenigen, die für Oligosaccharide und ihre korrespondierenden Antikörper gefunden wurden (zit.n.Sharon und Lis 1972). Die Spezifität von Lektinen kann über bestimmte Inhibitionstechniken ermittelt werden. Die Lektinbindungsstelle entspricht dem Zucker, der die Fähigkeit des Lektins zur Hämagglutination oder Glykokonjugatpräzipitation bei niedrigster Konzentration hemmt. Die meisten Lektine reagieren mit mehr als einem Monosaccharid. Lektine mit einer ähnlichen Spezifität für ein Monosaccharid können jedoch Unterschiede in der Affinität gegenüber komplexeren Kohlenhydraten zeigen (Stoward et al. 1980).
Die Zuckerbindungsstellen der Lektine variieren in der Größe von einer Monosaccharid - Einheit bis mindestens zu einem Tetrasaccharid (Sharon

und Lis 1972). Ihre Bindung ist u.a. abhängig von Temperatur und pH, aber auch von Änderungen in der chemischen Konfiguration: Beispielsweise reagiert das aus dem Weizenkeim gewonnene Lektin WGA spezifisch mit Sialinsäure und ß-N-Acetyl-Glucosamin. Die succinylierte Form dieses Lektins zeichnet sich jedoch durch eine negative Ladung aus, welche die ebenfalls negativ geladene Carboxylgruppe der Sialinsäure abstößt (Monsigny et al. 1980).

4.3.4.3.Die Avidin-Biotin/Peroxidase-Complex (ABC)-Methode

Für die lichtmikroskopische Erkennung von lektinbindenden Kohlenhydratresten kommt neben metallkolloidalen Techniken (Roth 1982, 1983; Manigley und Roth 1985) und der Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Methode die Avidin-Biotin/Peroxidase-Complex (ABC)-Methode in Betracht.

Nachdem Hsu und Raine 1981 ein immuncytochemisches Verfahren entwickelt hatten, in welchem ein biotinylierter Antikörper und ein Avidin-Biotin-Komplex verwendet wurden, dehnten sie diese Technik auch auf den kohlenhydrathistochemischen Nachweis mit Lektinen aus. Die ABC-Methode erschien den Autoren der indirekten Peroxidase - und der PAP-Methode hinsichtlich Empfindlichkeit und Spezifität überlegen (Hsu und Raine 1982).

Avidin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 68.000 und einer außerordentlich hohen Affinität gegenüber dem kleinen Vitamin Biotin (MW 244). Aufgrund der etwa einmillionenfach stärkeren Affinität im Vergleich zu Antigen/Antikörper-Bindungen gilt die nicht kovalente Bindung zwischen Avidin und Biotin als nahezu irreversibel (Wood und Warnke 1981). Ein im Rahmen der ABC-Technik verwendetes Avidinmolekül besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, von denen drei bereits mit Biotin/Peroxidase besetzt sind. Eine vierte wird für das biotinylierte Lektin freigehalten. Auf diese Weise entsteht auf dem nachzuweisenden Zuckerrest ein relativ großes Molekülgerüst, das anschließend mit einem geeigneten Medium sichtbar gemacht wird (Abb.6).

4.3.4.4.Spezifität der Lektine

In der vorliegenden Studie durchgeführte Adsorptionsversuche zeigten, daß die Lektinbindungen nicht durch Zugabe spezifischer Einfachzucker gehemmt werden konnten. Dies gilt insbesondere für UEA I (mitα-L-Fucose), DBA (mit GalNAc) und S-WGA (mit GlcNAc). Studien von Debray et al.(1981) haben jedoch gezeigt, daß nicht in jedem Fall der biochemisch, in vitro bestimmte spezifische Zucker das korrespondierende Lektin tatsächlich hemmt, d.h. eine Agglutination von Erythrozyten verhindert. Vielmehr spielt die Einbindung des entsprechenden Zuckers in die Kohlenhydratkette sowie die Größe des in die Lektinbindungsstelle passenden Rezeptorkomplexes eine entscheidende Rolle. Der Monosaccharidrest in terminaler Position einer Kohlenhydratkette ist nicht der einzige erkennbare Kohlenhydratanteil (Debray et al. 1981). Der in geringster Konzentration inhibierende Zuckerrest für Hämagglutination durch DBA ist so auch nicht das Monosaccharid GalNAc, sondern das Pentamer dieses Zuckers, welches zu einer vergleichbaren Hemmung eine um 40% niedrigere Konzentration als GalNAc allein benötigt. Dies kann als Hinweis auf die Größe der Zuckerbindungsstelle am Lektin gelten (Etzler und Kabat 1970). Gleichfalls kann hieraus eine Erklärung für die am Schnitt nicht sichtbare Hemmung von DBA durch den Einfachzucker GalNAc abgeleitet werden.

Ein Beispiel für die unterschiedlich ausgeprägte Zugänglichkeit eines Zuckerrestes für ein Lektin bieten histochemische Studien, die am Gefäßendothel mit zwei für Fucose spezifischen Lektinen UEA I und dem Lektin aus Lotus tetragonobulus (LTA) durchgeführt wurden (Holthöfer et al. 1982; Roussel 1985). Während UEA I mit fucosehaltigen Glykokonjugaten im Endothel reagierte, waren entsprechende Zuckerreste für LTA unzugänglich, vermutlich, weil die spezifische räumliche Anordnung der Oligosaccharidsequenz eine Bindung nicht zuließ. Andererseits ist die Verschiedenheit dieser beiden Lektine auch an den für sie unterschiedlichen Inhibitoren ablesbar. Während die Saccharidkonfiguration von α-L-Fuc(1-2-Gal-(1-4)-GlcNAc-(1-6)-R die UEA-Zuckerbindung 900-fach besser hemmt als Fucose allein (Pereira et al. 1978), reicht im Falle einer LTA-Inhibition das entsprechende Difucosylderivat aus.

Der beste in-vitro-Inhibitor für ein Lektin, d.h. der in der geringsten

Konzentration wirksame, stellt nicht unbedingt auch den tatsächlich im Schnitt nachgewiesenen komplementären Zuckerrest für das Lektin dar (Debray et al. 1981; Abb.7).

So wirkt für WGA GlcNAc 100-fach schwächer inhibierend als sein Trimeres (Chitotriose). Das Lektin PSA wird vom Glykopeptid 1 des humanen Lactoferrin deutlich stärker gehemmt als vom spezifischen Mannoserest allein. Andererseits ist für das GalNAc-spezifische Lektin SBA als wirkungsvollster Inhibitor das Monosaccharid GalNAc beschrieben worden (Lis et al. 1970; Debray et al. 1981). Die in der vorliegenden Studie festgestellte fehlende Hemmung von SBA durch GalNAc kann nur so interpretiert werden, daß eventuell Faktoren wie eine geringere Affinität oder die sterische Konfiguration am fixierten Schnittmaterial eine Rolle spielen.

Die unterschiedlichen Eigenschaften der im Prinzip für die gleichen Zuckerreste spezifischen Lektine SBA und DBA kommen am HVL der Ratte durch unterschiedliche Reaktionsmuster zum Ausdruck (s.u.). Dies könnte darauf hinweisen, daß die Gal-Reste verschiedenartig in die Kohlenhydratkette eingefügt vorliegen.

#### 4.3.4.5.Einfluß der Fixierung

An vielen Präparaten wurde randständig eine verstärkte Reaktion beobachtet, die möglicherweise auf Besonderheiten der Fixierung des Gewebes in diesen Bezirken oder aber auf einer besseren Zugänglichkeit der Reagentien für die nachzuweisenden Substrate in diesen Randarealen zurückzuführen sind. Dies gilt ebenso für andere histochemische Reaktionen (Eisenbindungsreaktion, Immuncytochemie). Die Fixierung hat entscheidenden Einfluß auf den Ausfall der lektinhistochemischen Reaktionen. Nach Carnoy- und Elftman-Fixierung waren gar keine bzw. nur gleichmäßig undifferenzierte Reaktionsergebnisse zu verzeichnen. Sehr schwache bis negative Reaktionen wurden auch nach Verwendung phosphatgepufferten Neutralformols verzeichnet. Als bestes Fixans stellte sich das Gemisch nach Bouin heraus; jedoch wurden auch bei dieser Fixierung nicht immer gleichmäßig gute Ergebnisse erzielt.

## 4.4. Diskussion der lektinhistochemischen Befunde

Wie aus den Befunden der vorliegenden Untersuchungen hervorgeht, markieren die Lektine von Dolichos biflorus (DBA) und Ulex europaeus I (UEA I) spezifische Zuckerreste (GalNAc, Fuc) in paranukleären Arealen der meisten Zellen des HVL. Diese Areale könnten elektronenmikroskopischen Studien zufolge (Bergeron et al. 1982) Cisternen und Vesikel des Golgi-Apparates darstellen. Dort findet der stufenweise Transfer von Zuckerresten (z.B. Gal, GalNAc, Sialinsäure, Fuc) auf die wachsende Oligosaccharidkette statt (Sharon 1984; Rothman und Lenhard 1984; Abb.4). Das gelegentliche Vorkommen von DBA- resp. UEA-Rezeptoren im Cytoplasma einzelner HVL-Zellen kann als Hinweis für eine schon weiter fortgeschrittene Glykosylierung einiger Hormone aufgefaßt werden.

Die Reaktionsmuster von DBA und UEA I ähneln einander auch nach Vorbehandlung der Hypophysenschnitte mit Neuraminidase. Auffallend ist die Konzentration stark reagierender, vorzugsweise runder Zellen in medioanterioren Abschnitten des HVL (Abb.18). Purves und Griesbach (1951) beschrieben diese Region als "Sex-Zone", wobei sie hauptsächlich runde, PAS-positive Zellen den gonadotropen Zellen zuordneten.

Die Tatsache, daß GalNAc- und Fuc- Reste im Golgi-Apparat unmaskiert vorliegen, im Cytoplasma jedoch erst nach Neuraminidase-Vorbehandlung erkennbar werden, spricht dafür, daß Sialinsäure außerhalb des Golgi-Apparates an die Oligosaccharidkette angeknüpft wird.

Ebenso wie DBA gilt das Lektin der Sojabohne (SBA) als GalNAc-spezifisch. Dennoch zeichnet es sich durch ein von DBA abweichendes Reaktionsmuster aus. Der meist schwach positive bis negative Reaktionsausfall ist nicht auf ein Fehlen von GalNAc-Resten zu beziehen, sondern zeigt nur, daß dieser Zuckerrest in einer Anordnung in der Oligosaccharidkette vorliegt, die für SBA nicht zugänglich ist. Die positive Reaktion nach DBA-Einsatz zeigt, daß GalNAc-Reste in einer für dieses Lektin günstigeren Anordnung vorhanden sind. Die starke positive Reaktion von SBA nach Vorbehandlung mit Neuraminidase kann zweierlei bedeuten: Erstens kann sie auf die Abspaltung von Sialinsäure und das Freiwerden SBA-zugänglicher Monosaccharide bezogen werden; zum anderen könnte eine nicht näher de-

finierbare unspezifische Neuraminidase-Wirkung in anderen Abschnitten die Konformation der Kohlenhydratkette so geändert haben, daß mit ihr SBA-Rezeptoren zugänglich gemacht wurden.

Ein weiteres Detail im UEA- bzw. DBA-Reaktionsmuster verdient nähere Betrachtung: Sehr häufig ist die paranukleäre, käppchenförmige Darstellung Lektin-zugänglicher Kohlenhydratanteile den Blutgefäßen abgewandt (Abb.17). Ob diese Beobachtung von allgemeiner Bedeutung ist, d.h. auch in anderen endokrinen Organen gemacht werden kann, und welche physiologische Bedeutung sich daraus ergeben könnte, muß vorerst offenbleiben.

Wie bereits oben näher geschildert, spielt nicht nur der spezifische Zuckerrest bei der Erkennung durch ein Lektin eine Rolle, sondern auch die spezifische Einknüpfung des Monosaccharides in die Kohlenhydratkette. Aus biochemischen Analysen ist bekannt, daß Fuc endständig in den Oligosaccharidkernstrukturen von FSH, LH und TSH anzutreffen ist (Hara et al. 1978; Bedi et al. 1982; Ponsin und Mornex 1983). Dementsprechend wäre also eine im Gewebeverband des HVL stark ausfallende Lektinreaktion zu erwarten, weil endständige Zucker als angreifbar gelten. In den histochemischen Befunden ist dies jedoch nur in den Golgi-Feldern der Fall. Außerhalb der Golgi-Felder gelegene cytoplasmatische Fuc-haltige Zuckerreste werden von UEA nur gelegentlich deutlich erkennbar besetzt. Aus diesem Widerspruch wäre zu folgern, daß die terminale Position eines Zuckers nicht unbedingt einen positiven Reaktionsausfall garantiert. Auch hier zeigt die deutliche Reaktionsverstärkung nach Einwirkung von Neuraminidase, wie offensichtlich entweder durch Abspaltung terminaler Sialinsäuren oder durch Änderung der Tertiärstruktur des Moleküls die Zugänglichkeit der Fuc für UEA erhöht wird (Abb.20).

UEA I markiert sehr häufig Blutgefäßwände. Die Frage, ob es sich dabei um Anteile bindegewebiger Herkunft oder um Endothelzellen handelt, kann wohl zugunsten der Endothelien beantwortet werden. Zwar sind diese Strukturen mittels lichtmikroskopischer Technik nicht eindeutig voneinander unterscheidbar; jedoch ist aufgrund von Untersuchungen an Endothelzell- und Fibroblastenkulturen bekannt, daß UEA I als Marker für Gefäßendothel besonders geeignet ist (Holthöfer et al. 1982; Roussel 1985).

Als besonders nützlich für die Charakterisierung von Kohlenhydratprofilen in normalen und pathologisch veränderten Geweben wird das Lektin der Erdnuß (PNA) angesehen (Stoward et al. 1980; Cooper 1982; Hennigar et al. 1985; Holthöfer et al. 1985; Schulte und Spicer 1985). Bei Vorliegen von O-glykosidisch über Threonin oder Serin verknüpften Glykoproteinen ist dieses Lektin für das präterminale Disaccharid D-Gal-ß-(1-3)-D-GalNAc (Gal/GalNAc) spezifisch (Lotan et al. 1975, Goldstein und Hayes 1978; Stoward et al. 1980). Da bei N-glykosidisch über Asparagin (Asn)-verknüpften Glykoproteinen dieses Disaccharid nicht zu erwarten ist (Debray et al. 1981), ist die PNA-Reaktivität auf Gal allein zu beziehen. In den vorliegenden Befunden weisen sehr schwach ausgeprägte Reaktionen des PNA mit seinem spezifischen Zucker auf eine eingeschränkte Zugänglichkeit des Lektins für Gal hin. Durch Vorbehandlung mit Neuraminidase kann die Anzahl PNA-bindender Rezeptoren im Schnitt beträchtlich vermehrt werden. Dies zeigt nicht nur die Präsenz von Sialinsäure in bestimmten HVL-Zellen, sondern signalisiert auch eine wahrscheinliche präterminale Stellung von Gal in der Kohlenhydratkette (Abb.9). Dieser Befund korreliert gut mit Beobachtungen anderer Autoren (Stoward et al. 1980; Schulte und Spicer 1985; Nakagawa et al. 1985) und wird auch durch biochemische Befunde bestätigt (Morell et al. 1968; Ashwell und Morell 1974; Springer und Desai 1982).

Mannose, ein Monosaccharid, welches in nicht-terminalen Positionen der Kohlenhydratketten von Glykoproteinhormonen vertreten ist, zeigt eine ausgesprochen gute Zugänglichkeit für sein spezifisches Lektin PSA. Zwar heben sich nur wenige Zellen intensiv hervor, doch sind praktisch alle Zellen des HVL deutlich angefärbt. Dies dürfte, was die Proteohormon-bildenden Zellen (STH, PRL, ACTH) betrifft, auf Struktur- und Enzymglykoproteine zurückzuführen sein. In den Glykoproteinhormon-bildenden Zellen ist die starke Anfärbbarkeit mit PSA wohl weniger auf die relativ hohe Man-Konzentration (6-8 Reste pro Gesamtmolekül für FSH) als vielmehr auf seine exponierte Stellung in verzweigten Kohlenhydratseitenketten zurückzuführen (Pierce 1974; Sairam und Papkoff 1974). Nakagawa et al. (1985) beschreiben zwei unterschiedlich stark reagierende Zelltypen, die sie jeweils TSH- und FSH-produzierenden Zellen zuordnen (s.u.). Nach Befunden von Kornfeld et al. (1981) ist Fuc für die PSA-Man-Bindung unentbehrlich.

Weizenkeim Agglutinin (WGA) gilt als spezifisch für GlcNAc und Sialinsäure (Rice und Etzler 1975; Bhavanandan und Katlic 1979; Goldstein und Hayes 1978). Am HVL jedoch läßt sich durch Neuraminidase-Vorbehandlung die ohnehin eher schwache Reaktion nicht nennenswert weiter abschwächen. Die sehr schwache WGA-Reaktion kann einerseits darauf zurückgeführt werden, daß $C_8$-und $C_9$-Reste der Sialinsäure die Bindung des Lektins an diesen Glykosylrest erschweren (Bhavanandan und Katlic 1979; Monsigny et al. 1980). Zudem ist beschrieben worden, daß terminale GlcNAc-Reste in Glykoproteinen, die N-glykosidisch über Asn verknüpft sind, nicht mit WGA reagieren (Goldstein et al. 1975). Hieraus folgt, daß WGA für den Nachweis von Sialinsäure und GlcNAc in HVL-Zellen offensichtlich nicht geeignet ist.

Ein ganz anderes Bild zeigt die Reaktion mit succinyliertem WGA (S-WGA). Die große Anzahl stark gefärbter Zellen spricht für eine dem Lektin gegenüber gute Zugänglichkeit von GlcNAc. Ein hoher Anteil ausgesprochen polygonaler Zellen charakterisiert dieses Bild, das sich dadurch - auch nach Vorbehandlung mit Neuraminidase - deutlich von den nach Neuraminidase/DBA und Neuraminidase/UEA I darstellbaren auffallend runden Zelltypen unterscheidet. Diese polygonalen Zellen legen sich mit langen zipfligen Ausläufern um andere, nicht reagierende Zellen, umschließen sie fast und gewinnen auf diese Weise Anschluß an Blutgefäße (Abb.14, 16). Diese offensichtlich kapillarentfernt liegenden Zellen können möglicherweise auch lokalen Einfluß auf die sie umgebenden Zellen ausüben. Hier wäre nicht nur an eine trophische Funktion zu denken, sondern auch Einwirkungen auf die sekretorische Leistung der betreffenden Zellen zu diskutieren. Eine derartige "parakrine" Funktion ist im Inselapparat des Pankreas nachgewiesen worden: Dort besitzen einzelne Zellen die Fähigkeit, über "Gap-junctions" direkt, d.h. unter Umgehung des Blutkreislaufs miteinander in Wechselwirkung zu treten ("metabolic coupling", Orci et al. 1973, 1984).

### 4.4.1. Struktur und Bedeutung der Sialinsäuren

Sialinsäurereste befinden sich an terminaler Stellung der Kohlenhydrat-Seitenketten zahlreicher im Tierreich vorkommender Glykokonjugate. Gewöhnlich ist der Sialinsäurerest in N-Glykosylproteinen an ein präter-

minales Gal-Molekül durch eine α-(2-6)-glykosidische Bindung geknüpft (Montreuil 1980). Nur selten kommen terminale Polysialylketten wie etwa in cerebralen Glykolipiden oder in Bakterien vor (Finne 1985; Finne und Mäkelä 1985). Der beim Menschen häufiger vorkommenden Form N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA) ist die histochemisch nicht von ihr unterscheidbare N-Glykolyl-Neuraminsäure (NGNA) entgegenzustellen (Gottschalk 1960, Abb.8). Mittlerweile sind mehr als 20 Derivate der Sialinsäure bekannt (Schauer 1982), die in der Mehrzahl Komponenten von Glykoproteinen, Glykolipiden, Oligo- und Polysacchariden darstellen. Nur ein sehr kleiner Anteil liegt in freier Form vor.

NANA, die an ihrer Seitenkette nicht O-acyliert ist, gilt bei Mensch und anderen Säugern als die hauptsächlich vorkommende Form (Haverkamp et al. 1975; Schauer 1978). Allerdings kommen $C_{7-9}$ bzw. $C_4$-acylierte Sialinsäuren in hoher Konzentration in Speicheldrüsen vieler Säuger vor (Haverkamp et al. 1975). FSH, LH und TSH beim Menschen enthält nach Befunden von Suttajit et al. (1971) N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA). Bisher wurde auch in anderen Glykoproteinhormonen verschiedener Säuger keine andere Sialinsäureform als NANA identifiziert (Corfield und Schauer 1982). Die genaue Konstitution der in der Rattenhypophyse vorkommenden Sialinsäure ist nicht bekannt. Histochemisch kann Sialinsäure spezifisch in Verbindung mit dem Neuraminidasetest mittels der Eisenbindungsreaktion nachgewiesen werden. Klessen (1973) beobachtete am HVL der Ratte drei verschiedene sialinsäurehaltige Zelltypen: Neben runden Formen, die den gonadotropen Zellen zuzuordnen waren, stellten sich ausgesprochen polygonale Zellen dar. Diese ordnete Klessen den thyrotropen Zellen zu. Eine dritte Form blieb unklassifiziert.

4.4.1.1.Zur Funktion der Kohlenhydratkomponente, insbesondere des Sialinsäureanteils in Glykoproteinen

Die Kohlenhydratreste der Glykoproteine dienen nicht nur als Rezeptoren für Antikörper, Toxine, Interferon oder infektiöse Mikroorganismen, sondern können das Molekül u.U. davor schützen, vorzeitig aus der Zirkulation entfernt zu werden (Hughes und Sharon 1978). Desweiteren scheint das Kohlenhydratgerüst für die Stabilität des Gesamtmoleküls verantwortlich zu sein (Chin und Habener 1981).

Sialinsäureresten kommt durch ihre terminale Stellung im Makromolekül eine besondere Aufgabe zu. Sie sind in die Membranaußenseite vieler Zellen eingefügt und verleihen diesen eine negativ geladene Oberfläche. Von besonderer Bedeutung sind diese Ladungseigenschaften beim Erythrozyten. Durch die Präsenz der Sialinsäuren im Membranglykoprotein "Glycophorin" wird eine Agglutination der Erythrozyten verhindert (Böhmer et al. 1979). Weiterhin beeinflußt der Gehalt an Sialinsäuren im Erythrozyten entscheidend dessen Lebensdauer (Eylar et al. 1962). Erythrozyten, denen mehr als 60% ihres Sialinsäuregehaltes entzogen wird, verschwinden innerhalb von 24 Stunden aus der Zirkulation (Jancik und Schauer 1974). Eine wichtige Rolle spielen Sialinsäuren auch in der Immunologie. Sie sollen u.a. dafür verantwortlich sein, daß eine Bildung von Antikörpern gegen eigenes oder transplantiertes Gewebe verhindert wird (Schauer 1975). Die ungestörte Entwicklung eines Embryo beispielsweise wird auf ein Sialinsäure-reiches Glykoprotein in den Trophoblastzellen zurückgeführt, die damit eine Immunbarriere aufbauen (Currie et al. 1968).

Ähnlich wie beim Erythrozyten wirkt sich bei vielen Serumglykoproteinen und Hormonen die Entfernung der Sialinsäure einschränkend auf ihre Halbwertzeit aus. Morell et al. (1968, 1982) sowie Ashwell und Morell (1974) haben gezeigt, daß das Serumglykoprotein Caeruloplasmin nach enzymatischer Desialisierung von Galactose-spezifischen Rezeptoren in der Hepatozytenmembran erkannt und abgebaut wird (vgl. Abb.9). Durch Entfernung des präterminalen Gal-Restes mittels Galactosidase konnte allerdings die Halbwertzeit des Asialoglykoproteins wieder verlängert werden (Ashwell und Morell 1974). Die Gal-spezifischen Rezeptoren in den Säugerhepatozyten sind gleichfalls an der Eliminierung experimentell desialisierter FSH-Moleküle beteiligt (Morell et al. 1971). Sialinsäure ist wesentlicher Bestandteil des ACTH-Rezeptors in den Zellen der Nebennierenrinde. Enzymatische Entfernung von Sialinsäure in isolierten Nebennierenrindenzellen hemmt die cAMP-Antwort auf ACTH-Stimulation (Haksar et al. 1974).

Zusammengefaßt ergeben sich folgende Aufgaben für Sialinsäuren (nach Reutter et al. 1982):

1. Gewährleistung einer negativen Ladung vieler Zellen und löslicher Glykokonjugate. Verhinderung von Aggregation, Agglutination und Präzipitation.

2. Schutz von Blutzellen und Glykokonjugaten vor vorzeitigem Abbau
3. Maskierung antigener Determinanten
4. Informationsaustausch zwischen Zellen mittels löslicher Glykokonjugate

Die Bedeutung endständiger Zuckerreste in einem Glykoprotein ist bisher am Beispiel der Sialinsäure erläutert worden. Im Organismus sind jedoch Rezeptoren nachgewiesen worden, die auch andere Glykosylreste binden können: Neben Fucose-spezifischen Rezeptoren in Säugerhepatozyten wurden Mannose- bzw. Glucosamin-erkennende Proteine im Retikulo-Endothelialen System der Säuger isoliert. Weiterhin sind beim Menschen Man-6-Phosphat-spezifische Rezeptoren in Fibroblastenkulturen nachgewiesen worden. Als weiteres Rezeptorensystem gelten Glucosamin-erkennende Proteine in Hepatozyten der Vögel (Übersicht bei Neufeld und Ashwell 1980). Aufgrund ihrer Inhibierbarkeit mit entsprechenden Zuckern erscheint es durchaus gerechtfertigt, diese Proteine als "endogene Lektine" zu bezeichnen.

Die Aufgabe dieser Rezeptorensysteme dürfte sowohl in der interzellulären Erkennung liegen, erstreckt sich aber auch auf Maßnahmen zur Liquidierung intakter oder angeschlagener Glykoproteine. Schließlich spielt wohl auch der Schutz vor infektiösen Mikroorganismen eine Rolle (Hughes und Sharon 1978).

4.4.1.2.Zur Wirkungsweise von Neuraminidase

Unter dem Begriff Neuraminidase (N-Acetyl-Neuraminosyl-Glykohydrolase, E.C. 3.2.1.18) wird eine große Gruppe sialinsäurespaltender Enzyme vorwiegend viraler oder bakterieller Herkunft zusammengefaßt.

Neuraminidasen (Sialidasen) spalten $\alpha$-glykosidisch verknüpfte Sialinsäurereste (Gottschalk und Drzeniek 1972). Auch die Art der $\alpha$-glykosidischen Bindung spielt für die Geschwindigkeit der Hydrolyse eine Rolle: Neuraminidase aus Vibrio cholerae spaltet im allgemeinen die $\alpha$(2-3)-Bindung um vieles leichter auf als die $\alpha$(2-6)-Bindung, während die nur sehr selten vorkommenden $\alpha$(2-8)-Verknüpfungen mäßig bis gar nicht einer enzymatischen Spaltung unterliegen (Schauer und Faillard 1968; Corfield und Schauer 1982). Ferner konnte nachgewiesen werden, daß sich N-Acetylneuraminsäure leichter enzymatisch von der Kohlenhydratkette trennen

läßt als N-Glykolyl-Neuraminsäure (Meindl und Tuppy 1966).

In der vorliegenden Untersuchung wurde nach Neuraminidase-Inkubation eine Häufung lektinreaktiver Zellen an medioanteriorer Stelle in der Nähe des Zwischenlappens beobachtet (s.o.). Gleichzeitig fiel auf, daß sich nach Neuraminidase-Inkubation ein Großteil der vorher deutlich reagierenden Golgi-Felder gegenüber verschiedenen nicht für Sialinsäuren spezifischen Lektinen färberisch negativ verhielt, was auf die Wirkung der Neuraminidase allein nicht zurückzuführen ist. Hier können Begleiteffekte kontaminierender Enzyme, Konformationsänderungen des betreffenden Glykoproteins infolge der Neuraminidase-Einwirkung oder aber die lange Inkubationszeit eine Rolle spielen. Auch ist nach Inkubation mit Acetatpuffer allein eine Abschwächung der Reaktion erkennbar (vgl. Schmitz-Moormann 1969). Zu einer markanten Anfärbung einzelner Zellen wie nach Neuraminidase-Vorbehandlung kommt es dabei allerdings nicht.

### 4.4.2. Perjodsäureoxidation der Schnitte

Im Unterschied zur färberischen Darstellung von Kohlenhydrat-Bausteinen im Gewebe mittels der PAS-Reaktion wird die Perjodsäureoxidation im Zusammenhang mit Neuraminidase-lektinhistochemischen Untersuchungen zur Differenzierung O-acylierter Sialinsäurereste verwendet.

Sehr stark verdünnte Perjodsäure (1 mM) in begrenzter Einwirkungszeit (15 min) soll ausschließlich die exozyklischen Diole der Neuraminsäure oxidieren (McLean et al. 1970; Roberts 1977; Suttajit et al. 1971). Sie erfaßt dagegen nicht Sialinsäuren, die $C_8$-O-acyliert, $C_7$-$C_9$-di-O-acyliert oder $C_7$, $C_8$, $C_9$-tri-O-acyliert sind (Culling und Reid 1977; Reid und Culling 1980). Entsprechende Diole anderer Zuckerreste (z.B. Man, Gal u.a.m.) werden unter diesen "milden" Bedingungen nicht oxidiert (Marshall und Neuberger 1972). Das Oxidationsprodukt, d.h. die oxidierte "Sialinsäure" wird von Neuraminidase nicht erkannt, so daß auch die folgende Inkubation mit Lektinen, welche für präterminale Zuckerreste spezifisch sind, zu keinen oder nur sehr schwachen Anfärbungen führt.

Da in vorliegenden Untersuchungen die Oxidation mit 1 mM Perjodsäure

zu keiner Verstärkung der Lektinreaktionen nach Neuraminidasebehandlung führte, kann angenommen werden, daß nur solche Sialinsäurereste vorlagen, die von Perjodsäure oxidiert werden können, also nicht acylierte bzw. $C_7$-oder $C_9$-O-acylierte. Da auch eine KOH-Vorbehandlung (KOH/Neuraminidase/Lektin) zu keiner Verstärkung der Reaktion führte, verbleibt als anzunehmende Sialinsäureform nur die nicht acylierte: Perjodsäure hat alle im Schnitt erreichbaren Sialinsäurereste oxidiert und somit dem Angriff der Neuraminidase entzogen.

Andererseits ist auch eine erhebliche Abschwächung der Reaktion nach Perjodatoxidation der HVL-Schnitte gegenüber Lektin allein festgestellt worden, d.h. gegenüber den Zuckerresten, die primär frei im Golgifeld vorlagen. Es addieren sich offensichtlich zwei Wirkungen der Perjodsäure: Zum ersten werden die Sialinsäurereste oxidiert und damit für Neuraminidase unangreifbar. Andererseits werden durch die Perjodsäureoxidation offensichtlich auch andere Zucker in ihrer Struktur so verändert (Spaltung von -C-C-Bindungen, Entstehung von Aldehydgruppen), daß sie von entsprechenden Lektinen nicht mehr erkannt werden.

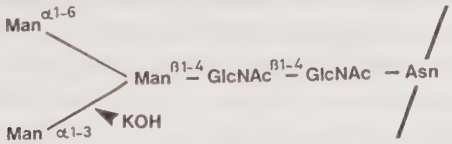
Gleichwohl steht die offensichtlich aggressive Wirkung von sehr milder Perjodsäure nicht im Einklang mit den von Marshall und Neuberger gemachten Beobachtungen, wonach 30 mM Perjodsäure keine Auswirkungen auf die mit Sialinsäure verknüpften benachbarten Zucker haben soll. Hara et al. (1978) zeigten, daß nach Einwirkung von 0,05 M Natrium-Metaperjodat über 20 Stunden (4°C, Dunkelheit) Gal-Reste zerstört wurden, GlcNAc aber erhalten blieb. Es sei ferner darauf hingewiesen, daß ähnliche Befunde wie die hier mitgeteilten auch von anderen Autoren beschrieben wurden (Schulte und Spicer 1985), und daß die Ergebnisse nicht in vitro, d.h. in der Küvette, sondern am histologischen Schnitt erzielt wurden.

Die Aussagekraft hinsichtlich des Vorkommens acylierter Sialinsäuren im Schnitt wird auch dadurch beeinträchtigt, daß die Grenzen einer "milden" Oxidation nicht genau festgelegt werden können (vgl. Klessen 1978, Klessen und Graumann 1978, Culling und Reid 1982).

### 4.4.3. Alkali-Behandlung der Schnitte

Diejenigen Sialinsäurereste, die aufgrund der O-Acylierung ihrer Polyhydroxyl-Seitenkette primär nicht erkennbar sind, können nach Entfernung der Acylreste mittels Alkali von Neuraminidase erkannt und abgespalten werden. Gegenüber den Befunden der Neuraminidase-Lektin-Sequenz bewirkt die Vorbehandlung der Schnitte mit KOH keine Verstärkung der cytoplasmatischen Reaktion. Dies korrespondiert gut mit den Befunden aus der milden Perjodsäureoxidation: Es sind keine O-acylierten Sialinsäuren in histochemisch erfaßbarer Menge im Cytoplasma der Glykoproteinhormon produzierenden Zellen vorhanden. Andererseits weist die gelegentlich nachweisbare Abschwächung der KOH-Neuraminidase-Lektin-Reaktion noch auf andere mögliche Wirkungen von KOH auf die Kohlenhydratkette hin.

Eine KOH-Einwirkung im Sinne einer Spaltung glykosidischer oder Kohlenhydrat-Protein-Bindungen an Glykoproteinhormonen ist nach Literaturangaben nur an der 1-3-glykosidischen Bindung intern angeordneter Mannose-Reste in der Oligosaccharidkernsequenz möglich (Marshall und Neuberger 1972; Bahl und Shah 1977; Kornfeld et al. 1981):




Die eventuelle Spaltung dieser Bindung hat jedoch in der vorliegenden Studie so gut wie keinen Einfluß auf die anschließende Lektinreaktion gehabt.

### 4.4.4. Saure Hydrolyse

Da sich die glykosidischen Bindungen zwischen Sialinsäure und präterminalen Zuckerresten gegenüber Alkali als resistent erwiesen, wurde untersucht, inwieweit diese durch saure Hydrolyse aufspaltbar sind. Entsprechend ist darauf hingewiesen worden, daß die Einwirkung methanolischer HCl auch eine Abspaltung des Sialinsäuremoleküls bewirken kann (Klenk 1956; Quintarelli 1963; Quintarelli et al. 1964; Spicer und

Warren 1960; Neuberger und Ratcliffe 1972). Die Desialisierung mit verdünnten anorganischen Säuren besitzt ebenso wie die Enzymbehandlung mit Neuraminidase den Nachteil einer gewissen Resistenz O-acylierter Sialinsäuren, die jedoch durch Vorbehandlung mit KOH ausgeglichen werden kann; sie vermeidet jedoch Probleme bezüglich der Kontamination mit anderen Enzymen, die beim Gebrauch von Neuraminidase entstehen können (Culling & Reid 1982). Nach den Ergebnissen biochemischer Untersuchungen ist unter den Bedingungen einer "milden" Hydrolyse durch methanolische HCl mit einer Abspaltung anderer Zuckerreste als Sialinsäure (Clamp et al. 1967; Sharon 1975) oder Fucose (Sharon 1975) offensichtlich nicht zu rechnen.

In einem gewissen Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse der vorliegenden Studie: Hierbei zeigte sich nach Vorbehandlung der Schnitte mit methanolischer HCl eine Abschwächung auch der für andere Zucker spezifischen Lektinreaktionen. Kiessen (1973) beobachtete nach saurer Hydrolyse (24h, 37°C, 0,05 N HCl, pH 1,5) eine deutliche Abschwächung der auf Sialinsäure-Vorkommen zu beziehenden Eisenbindungsreaktion bestimmter EBR-positiver HVL-Zellen der Ratte. Aus diesem Befund und den vorliegenden Ergebnissen kann gefolgert werden, daß nach Einwirkung stark verdünnter HCl nicht nur Sialinsäure, sondern auch weitere Kohlenhydratbestandteile derart verändert werden, daß Lektine modifizierte - offensichtlich ungünstigere - Bindungsverhältnisse vorfinden.

### 4.5. Immuncytochemische Untersuchungen

Die thyrotropen Zellen zeichnen sich durch einen außerordentlichen Formenreichtum aus: Es treten große und kleine runde, aber auch extrem polygonale Zellformen auf (Abb.22 a,b). Gonadotrope Zellen sind hingegen praktisch nie polygonal. Diese Befunde stehen im Einklang mit einer großen Anzahl früherer Beobachtungen (Girod 1983, Lit.). Übereinstimmend mit Girod (1983) ist eine Häufung der gonadotropen Zellen in der mittleren Region des Seitenlappens zu beobachten, wobei besonders auf die medioanteriore Region der Pars distalis hingewiesen sein soll. Dies entspricht Befunden, die bereits 1951 von Purves und Griesbach erhoben wurden.

Tougard et al. (1980) lokalisierten die TSH-Zellen im posterioren Ab-

schnitt der Pars distalis bei der Ratte. Sie stellten zudem eine - im Vergleich zu den gonadotropen Zellen - deutlich geringere Zellzahl fest. Die in vorliegenden Untersuchungen festgestellte fast gleichmäßige Zelldichte steht diesen und ähnlichen anderen Befunden entgegen (El Etreby und Fath El Bab 1978: Hund). In der menschlichen Hypophyse jedoch fanden Phifer und Spicer (1973) den Hauptanteil der thyrotropen Zellen in medioanterioren Arealen, in denen auch die gonadotropen Zellen gehäuft vorkommen.

Die Aussagekraft einer immuncytochemischen Reaktion ist in erster Linie von der Spezifität der verwendeten Antikörper abhängig. Während bei Verwendung eines "totalen" Hormon-Antikörpers, d.h. eines Antikörpers, welcher gegen beide Proteinketten des entsprechenden HVL-Hormons gerichtet ist, eine vorherige Adsorption mit nicht erwünschtem Antigen unerläßlich ist (Phifer und Spicer 1973; Girod 1983), haben wir auf ein derartiges Vorgehen verzichtet, da Antikörper gegen die ß-Kette des jeweiligen Hormons verwendet wurden. Die ß-Kette ist hormonspezifisch, während die $\alpha$-Ketten verschiedener HVL-Hormone weitgehend identisch und sogar untereinander austauschbar sind (Pierce 1974; Pierce et al. 1975). Von weiterer Bedeutung ist die Verdünnung des Antikörpers: Sie sollte möglichst hoch sein, um unspezifische Antikörper herauszuverdünnen. Obwohl in unseren Untersuchungen ß-Ketten-Antikörper in hohen Verdünnungen verwendet wurden, reagierte ein Teil der als gonadotrop erkannten Zellen auch mit Anti-ß-TSH. Allerdings wurde keine Kreuzreaktion der Anti-Gonadotropine mit polygonalen Zellen beobachtet.

### 4.6. Kombination immuncytochemischer mit lektinhistochemischen Methoden

Die Doppelinkubationen wurden am selben Schnitt vorgenommen, wobei Antikörper gegen Hormone des HVL und Lektine für spezifische Zuckerreste verwendet wurden. Dabei zeigte sich, daß LH-Zellen als Kohlenhydratbestandteile hauptsächlich Gal, GalNac, Man, GlcNAc und Fuc enthalten. Die Ähnlichkeit der Befunde zur Kombination Lektine/FSH ist nicht weiter verwunderlich , da beide Hormone in denselben Zellen gebildet werden können (Girod 1983, Lit.). Das terminale Disaccharid Sialinsäure-Galactose ist bei gonadotropen Hormonen auch von Nakagawa et al.(1985)

- dort mit Hilfe einer anderen Technik als der hier verwendeten - gefunden worden. Hingegen konnte in gonadotropen Zellen Fucose (mit UEA I) von Nakagawa et al. nur vereinzelt nachgewiesen werden. In unseren Untersuchungen jedoch reagierte Fucose-spezifisches UEA I sowohl mit Zellen, welche entsprechend dem Ergebnis der immuncytochemischen Reaktion gleichzeitig FSH bzw. LH enthielten, als auch mit solchen, in denen keine Gonadotropine nachweisbar waren. Als dritte Zellgruppe fiel diejenige auf, die Gonadotropine, aber keine lektinhistochemisch nachweisbare Fucose enthielt.
Fucose ist stets mit einem GlcNAc-Baustein der Oligosaccharideinheit verknüpft. Als externes Monosaccharid dürfte es einer Lektinbindung eher zugänglich sein als ein mittständiger Kohlenhydratbaustein. Fuc liegt - wie aus den lektinhistochemischen Befunden hervorgeht - in den Golgi-Feldern zahlreicher HVL-Zellen sowie bei einem Teil der rund bis oval geformten Zellen auch im Cytoplasma vor. Wahrscheinlich sind in den Zellen des HVL erheblich mehr Fuc-Reste vorhanden, wobei allerdings die Konformation eines Teiles der Fuc-tragenden Glykoproteinhormone (Gonadotropine, TSH) möglicherweise durch verschiedenartige Einflüsse (z.B. weitere Glykosylierung der terminalen Kohlenhydratkette oder Neuraminidase-Wirkung) so verändert ist, daß die Lektinbindung an den Zukkerrest verhindert wird. Das Fehlen von UEA-Reaktivität im Schnitt ist somit kein Beweis für das Fehlen von Fuc-Resten im Hormonmolekül.

Das Ergebnis nach Doppelinkubation von Lektinen und Anti-ß-TSH unterscheidet sich von entsprechenden Befunden, die mit Lektin-Anti-ß-FSH/LH gefunden wurden, dahingehend, daß TSH oft in geringerem Ausmaß glykosyliert erscheint. Die unterschiedlich ausgeprägte Glykosylierung individueller HVL-Glykoproteidhormone, als sog. "Mikroheterogenität" bezeichnet, ist schon seit längerem bekannt (Cunningham et al. 1965; Spiro 1970). So sollen sich beispielsweise auf drei Moleküle TSH 1,3 Fucose- und 1 Galactose-Rest verteilen. Dies bedeutet natürlich, daß einige Hormonmoleküle diese Zuckerreste nicht besitzen (Pierce et al.1975, Diskussionsbemerkung).

TSH kann auch unvollständig glykosyliert ausgeschleust werden (Ruddon et al.1979; Weintraub et al.1980). Dies erklärt vielleicht die in den thyrotropen Zellen mittels histochemischer Technik nachweisbare,besonders

auffällige heterogene Glykosylierung. Anders verhält es sich hingegen mit FSH. Chappel (1981) demonstrierte im HVL des Hamsters zwei FSH-Formen, die ein unterschiedliches Bindungsverhalten zum Lektin Concanavalin A zeigten. Dies führt der Autor auf Unterschiede in der Glykosylierung beider Formen zurück. Nur das vollständig glykosylierte FSH soll ausgeschleust werden (Chappel 1981).

Die nicht glykosylierten Vorstufen von $\alpha$-TSH zeigen nach Befunden von Kourides et al. (1979) schwächeres antigenes Verhalten im Immunpräzipitationstest im Vergleich zum Verhalten von reifem $\alpha$-TSH. Dies kann als Bestätigung dafür aufgefaßt werden, daß die vollständige Glykosylierung erst die endgültige Konformation des Hormons im Sinne einer Stabilisierung besorgt.

Anderes gilt für das humane Choriongonadotropin, einem Glykoprotein der Plazenta: Kalyan und Bahl (1983) stellten fest, daß deglykosyliertes Choriongonadotropin sich gegenüber dem vollständigen Molekül nur in der Ausprägung der hormonellen Aktivität unterscheidet, nicht jedoch in der Assoziation der Untereinheiten und in Antikörper- oder Rezeptorbindungsaktivität.

Das Galactosamin-spezifische Lektin DBA liegt - im Unterschied zu Beobachtungen Nakagawas et al. (1985), die keine Beziehung dieses Lektins zu funktionell aktiven HVL-Glykoproteinen feststellten - in unterschiedlicher topographischer Verteilung innerhalb des HVL vor: Bei aller Vorsicht in der Interpretation der Befunde läßt sich nach dorsal ein größerer Anteil von LH-Zellen feststellen, die keine DBA-Rezeptoren besitzen. Basal und vor allem medioanterior ändert sich offensichtlich der Glykosylierungsgrad der Gonadotropine hinsichtlich des DBA-spezifischen GalNAc. Es muß jedoch festgehalten werden, daß derartige Gradienten in verschiedenen Abschnitten des HVL nur in diesem Falle (DBA-LH) erkennbar waren.

Mannose wird in allen Glykoproteinhormon-produzierenden Zellen gefunden, vermutlich, weil es, wie oben erwähnt, ein essentieller Bestandteil der Oligosaccharidkernstruktur, die schon während der Proteinsynthese entsteht (Giudice und Weintraub 1979), darstellt. Im Gegensatz zu Nakagawa et al. (1985), die zwei unterschiedlich stark gefärbte Zelltypen unter-

scheiden und diese gonadotropen resp. thyrotropen Zellen zuordnen, können wir uns angesichts der Vielzahl in unterschiedlicher Intensität angefärbten Zellen zu einer ähnlichen Einordnung nicht entschließen. Die Heterogenität der Mannose-spezifischen PSA-Reaktion könnte sich auch damit erklären, daß im Laufe des sukzessiven Transfers von Kohlenhydratbausteinen in einer Intermediärphase ein Polymannosylgerüst aufgebaut wird, welches später, im Rahmen der terminalen Glykosylierung wieder durch Glykosyltransferasen reduziert wird (Schachter und Roseman 1980, vgl.Abb.4).

Glucosamin ist, ähnlich wie Fuc und Man, ein Hauptbestandteil der Oligosaccharidkernstruktur. Es ist in FSH-Zellen jedoch relativ häufig nicht nachweisbar, obwohl es aufgrund seiner hohen Konzentration im Follitropin erwartet werden kann. Es ist zu vermuten, daß, ähnlich wie schon bei Fuc angenommen, durch die spezielle räumliche Anordnung des Moleküls die Lektinbindungsstellen teilweise verdeckt werden. In den medioanterioren Bezirken kommen auch runde GlcNAc-positive Zellen vor, in denen sich gleichfalls FSH nachweisen läßt. Die weniger zahlreichen polygonalen Lektin-positiven Zellen erscheinen mehr in posterioren Abschnitten des HVL und lassen sich nicht mit FSH-Zellen in Verbindung bringen. Die Tatsache, daß eher die runden GlcNAc-positiven, weniger aber die polygonalen Zellen mit FSH assoziiert sind, bestätigt die im Kapitel "Immuncytochemische Befunde" getroffenen Aussagen hinsichtlich der Form gonadotroper Zellen.

Es wurde mittels histochemischer Technik nachgewiesen, daß verschieden glykosylierte Formen der Gonadotropine und des TSH in den Zellen des HVL der Ratte vorliegen. Die Bedeutung der Kohlenhydratkette, insbesondere ihres terminalen Anteils, ist auch heute im wesentlichen noch unklar. Zwar konnte beispielsweise die Bedeutung der Sialinsäure für die Halbwertzeit des FSH anschaulich demonstriert werden (Suttajit et al.1971), jedoch gelten diese Befunde nicht für das menschliche TSH (Pierce 1974). Auch verhält sich ein deglykosyliertes HCG hinsichtlich der Antikörper resp. Rezeptorbindungsaktivität anders als ein deglykosyliertes TSH (Kourides et al. 1979; Weintraub et al. 1979; Kalyan und Bahl 1983).

Die Mikroheterogenität kann Ausdruck einer unterschiedlichen Ausreifung des Hormonmoleküls sein (Hara et al. 1978; Weintraub et al. 1979). Zum anderen ist aber auch damit zu rechnen, daß die unterschiedliche Glykosylierung der hypophysären Glykoproteine die Sekretionskinetik und auch die Funktion am Zielorgan beeinflußt (Sharon 1984).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden mit lektinhistochemischen Techniken Kohlenhydratreste in den Glykoproteinhormon-produzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) der Ratte nachgewiesen. Dabei wurden Lektine verwendet, welche für die Bausteine der Kohlenhydratkernstruktur (GlcNAc, Man) sowie für terminale Zuckerreste (Fuc, GalNAc, Gal) in hypophysären Glykoproteinen spezifisch sind.

Durch Präinkubation der Schnitte mit Neuraminidase wurde nicht nur indirekt Sialinsäure nachgewiesen. Es zeigte sich vielmehr auch, daß durch Enzymvorbehandlung das Reaktionsverhalten der Kernstruktur-Kohlenhydrate gegenüber dem Lektin nicht verändert wurde. Dagegen stellten sich deutliche Unterschiede im Reaktionsverhalten terminaler Zuckerreste vor bzw. nach Neuraminidase- Inkubation heraus:
Gal ist für das spezifische Lektin PNA nicht zugänglich. Es kann erst mit Hilfe der Sequenz Neuraminidase-PNA dargestellt werden und legt somit die Annahme einer präterminalen Position in der Kohlenhydratkette nahe. GalNAc und Fuc wurden mit den Lektinen DBA und UEA I in den Golgi-Feldern verschiedener HVL-Zellen nachgewiesen. Neuraminidase-Vorbehandlung demaskierte weitere entsprechende Lektinbindungsstellen im Cytoplasma dieser Zellen. Reaktionsstärke und -muster einer lektinhistochemischen Reaktion sind nicht nur von der Spezifität des Lektins, sondern auch von der besonderen Einbindung des Monosaccharides in seine Kohlenhydratkette abhängig. Dies wird am unterschiedlichen Reaktionsausfall der beiden für GalNAc spezifischen Lektine SBA und DBA gezeigt. Terminale Positionen eines Zuckers sind nicht unbedingt für eine optimale Reaktion erforderlich. Ebensowenig müssen intern angeordenete Zucker der Erkennung durch Lektine entgehen. Weiterhin wurden mit Hilfe einer Kombination immuncytochemischer und lektinhistochemischer Methoden Reaktionen durchgeführt, die eine topographische Zuordnung verschiedener Zuckerreste zu den Glykoproteinhormonen FSH, LH und TSH erlaubten. Dabei zeigte sich folgendes:
LH-Zellen binden am deutlichsten die für Man und Gal spezifischen Lektine. Andere Zuckerreste, z.B. Fuc und GalNAc waren nur teilweise in LH-produzierenden Zellen nachzuweisen. Für FSH-Zellen gilt ähnliches wie für die LH-produzierenden Zellen: Man und Gal waren in allen FSH-Zellen

in Positionen vorhanden, in welchen sie von Lektinen erkannt werden konnten. In TSH-produzierenden Zellen ließen sich die untersuchten Zucker seltener darstellen. Als für Lektine erreichbare Hauptkomponenten der Kohlenhydratketten sind in TSH-Zellen eindeutig nur Man, Fuc und GalNAc nachzuweisen.

Der Nachweis sowohl nicht lektinbindender als auch lektinbindender gonadotroper und thyrotroper Zellen läßt darauf schließen, daß jedes Glykoproteinhormon in unterschiedlich glykosylierten Formen vorliegt. Dies kann zum einen Ausdruck der unterschiedlichen Ausreifung der hypophysären Glykoproteinhormone sein. Darüberhinaus ist bekannt, daß TSH im Gegensatz zu FSH auch unvollständig glykosyliert ausgeschleust werden kann. Diese Mikroheterogenität kann sich auf die biologische Funktion des entsprechenden Hormons am Zielorgan auswirken. Möglicherweise wird dadurch auch die Sekretion der Hormone des Hypophysenvorderlappens beeinflußt.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Arnold, M.: Die Verwendbarkeit von Metallsolen zum elektronenmikroskopischen Nachweis von sauren Mukopolysacchariden.
Acta histochem.(Jena), Suppl.Band X, 149-163 (1971)

Ashwell, V., Morell, A.G.: The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins.
Adv.Enzymol. 41, 99-128 (1974)

Bahl, O.P., Shah, R.H.: Glycoenzymes and Glycohormones. In: The Glycoconjugates Vol.1 (Horowitz,M.I.,Pigman,W. eds),385-415
Academic Press, New York 1977

Balzing, P., Gold, E.R., Boroff, D.A., Roberts, J.A.: Observations on receptor specific proteins. II. Hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions of clostridium botulinum types A, C, D and E hemagglutinins.
Immunology 25, 773-782 (1973)

Bedi, G.S., French, W.C., Bahl, O.P.: Structure of carbohydrate units of ovine luteinizing hormone.
J.Biol.Chem. 257, 4345-4355 (1982)

Bergeron, J.J.M., Rachubinski, R.A., Sikstrom, R.A., Posner, B.I., Paiement, J.: Galactose transfer to endogenous acceptors within Golgi fractions of rat liver.
J.Cell Biol. 92, 139-146 (1982)

Bhavanandan, V.P., Katlic, A.W.: The interaction of wheatgerm agglutinin with sialoglycoprotein.
J.Biol.Chem. 254, 4000-4008 (1979)

Böhmer, F.D., Kirschke, H., Bohley, P., Schön, R.: Membrane sialoglycoprotein from human erythrocytes activates lysosomal proteinases.
Acta Biol.Med.Ger. 38, 1521-1526 (1979)

Boyd, W.C., Shapleigh, E.: Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins).
Science 119, 419 (1954)

Bugnon, C., Fellmann, D., Lenys, D., Bloch, B.: Etude cytoimmunologique des cellules gonadotropes et des cellules thyréotropes de l'adénohypophyse du rat.
C.R.Soc.Biol.(Paris) 171, 907-913 (1977)

Inoue, S.I.: The presence of two species of follicle-stimulating hormone within hamster anterior pituitary gland as disclosed by Concanavalin A chromatography
Endocrinology 109, 935-942 (1981)

Child, Moriarty, G.M., Ellison, D.B., Hamaley, J.A.: Storage of anterior lobe adrenocorticotropin on corticotropes and a subpopulation of gonadotropes during the stress nonresponsive period in neonatal male rat.
Endocrinology 110, 1676-1682 (1982)

Ivins, M.M., Roberts, J.F.: Thyroid-stimulating hormone subunit: evidence from endoglycosidase-H cleavage for late presecretory glycosylation.
Endocrinology 108, 1628-1633 (1981)

Clamp, J.R., Dawson, G., Hough, L.: The simultaneous estimation of 6-deoxy-L-galactose (L-Fucose), D-mannose, D-galactose, 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose (N-acetyl-glucosamine) and N-acetylneuraminic acid (sialic acid) in glycopeptides and glycoproteins.
Biochim.Biophys.Acta 148, 342-349 (1967)

Coons, A.H., Kaplan, M.H.: Localization of antigens in tissue cells. II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.
J.Exp.Med. 91, 1-13 (1950)

Cooper, H.S.: Peanut lectin-binding sites in large bowel carcinoma.
Lab.Invest. 47, 383-390 (1982)

Corfield,A.P., Schauer, R.: Metabolism of Sialic Acids. In: Sialic Acids. Chemistry, Metabolism and Function. (Schauer,R. ed.),Cell Biol.Monographs Vol.10, 195-261, Springer Verlag,Wien 1982

Culling, C.F.A.: A Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques. 3rd ed. Butterworth, London 1974

Culling, C.F.A., Reid, P.E.: The apparent failure of sodium borohydride reaction to block further PAS reactivity in rat epithelial mucins.
Histochem.J. 9, 781-785 (1977)

Culling, C.F.A., Reid, P.E.: Histochemistry of Sialic Acids. In: Sialic Acids. Chemistry, Metabolism and Function. (Schauer,R. ed.), Cell Biol. Monographs Vol.10, 273-193, Springer Verlag, Wien 1982

Culling, C.F.A., Reid, P.E., Dunn, W.L.: The effect of saponafication upon certain histochemical reactions of the epithelial mucins of the gastrointestinal tract.
J.Histochem.Cytochem. 19, 654-662 (1971)

Culling, C.F.A., Reid, P.E., Clay, M.G., Dunn, W.L.: The histochemical demonstration of O-acetylated sialic acid in gastro-intestinal mucins. Their association with the potassium hydroxide-periodic acid-Schiff effect.
J.Histochem.Cytochem. 22, 826-831 (1974)

Cunningham, L.W., Ford, J.D., Rainey, J.M.: Heterogeneity of ß-aspartyl-oligosaccharides derived from ovalbumin.
Biochim.Biophys.Acta 101, 233-235 (1965)

Currie, G.A., van Doorninck, W., Bagshawe, K.D.: Effect of neuraminidase on the immunogenicity of early mouse trophoblast.
Nature 219, 191- 192 (1968)

Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G., Montreuil, J.: Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins.
Eur.J.Biochim. 117, 41-55 (1981)

Dubois, M.P., Gräf, L.: Demonstration by immunofluorescence of the lipotropic hormone LPH in bovine, ovine and porcine adenohypophysis.
Horm.Metab.Res. 5, 220 (Abstr., 1973)

El Etreby, M.F., Fath El Bab, M.R.: Localization of thyrotropin (TSH) in the dog pituitary gland. A study using immunoenzyme histochemistry and chemical staining.
Cell Tiss.Res. 191, 205-218 (1978)

Etzler, M.E., Kabat, E.A.: Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with blood group A specifity from Dolichos biflorus.
Biochemistry 9, 869-877 (1970)

Eylar, E.H., Madoff, M.A., Brody, O.V., Oncley, J.L.: The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte.
J.Biol.Chem. 237, 1992-2000 (1962)

Finne, J.: Polysialic acid - a glycoprotein carbohydrate involved in neural adhesion and bacterial meningitis.
TIBS 10, 129 (1985)

Finne, J., Mäkelä, P.H.: Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase. J.Biol.Chem. 260, 1265-1270 (1985)

Girod, C.: Immunocytochemistry of the Vertebrate Adenohypophysis. Handbuch der Histochemie (Graumann, W., Neumann, K-H. eds) Vol.VIII, Suppl.Part.5, G.Fischer Verlag Stuttgart - New York 1983

Giudice, L.C., Weintraub, B.D.: Evidence for conformational differences between precursor and processed forms of thyroid-stimulating hormone ß-subunit. J.Biol.Chem.254, 12679-12683 (1979)

Gold, E.R., Phelps, C.F.: Provisional classification of receptor-specific proteins (antibody-like substances). Z.ImmunForsch. 143, 430-434 (1972)

Goldstein, I.J., Hayes, C.E.: The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. Advanc.Carbohyd.Chem.Biochem. 35, 127-340 (1978)

Goldstein, I.J., Hammastrom, S., Sundblad, G.: Precipitation and carbohydrate-binding specifity studies on wheat germ agglutinin. Biochim.Biophys.Acta 405, 53-61 (1975)

Goldstein, I.J., Hughes. R.C., Monsigny, M., Osawa, I., Sharon, N.: What should be called a lectin? Nature 285, 66 (1980)

Gottschalk, A.: The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances. Cambridge University Press, Cambridge 1960

Gottschalk, A., Drzeniek, R.: Neuraminidase as a tool in structural analysis. In: Glycoproteins. (Gottschalk, A. ed), 381-402, Elsevier Amsterdam 1972

Graham, R.C., Karnovsky, M.J.: The early stages of absorption of injected horse-radish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J.Histochem.Cytochem. 14, 291-302 (1966)

Haksar, A., Mandsley, D.V., Kimmel, G.L., Peron, F.G., Robidoux, W.R.,Jr, Gahnon, G.: Adrenocorticotropin stimulation of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate formation in isolated rat adrenal cells. The role of membrane sialic acid. Biochim.Biophys.Acta 362, 356-365 (1974)

Hale, C.W.: Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues.
Nature, Lond. 157, 803 (1946)

Hara, K., Rathman, P., Saxena, B.B.: Structure of the carbohydrate moieties o γ-subunits of human follitropin, lutropin, and thyrotropin.
J.Biol.Chem. 253, 1582-1591 (1978)

Haverkamp, J., Schauer, R., Wember, M., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G.: Synthesis of 9-O-acetyl and 4,9-di-O-acetyl derivates of the methylester of N-acetyl-ß-D-neuraminic acid methylglycoside. Their use in periodate oxidation studies.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 356, 1575-1538 (1975)

Henningar, R.A., Schulte, B.A., Spicer, S.S.: Heterogenous distribution of glycoconjugates in human kidney tubules.
Anat.Rec. 211, 376-390 (1985)

Herbert, D.C.: Localization of antisera to LH ß and FSH ß in the rat pituitary gland.
Amer.J.Anat. 144, 379-385 (1975a)

Herbert, D.C.: Immunocytochemical identification of the gonadotrophs in the rat adenohypophysis using antisera to the beta subunits of LH and FSH. In: 10th Int.Cong.Anat.Tokyo (Yamada, E., ed) 276.- Science Council of Japan, Tokyo 1975b

Herbert, D.C.: Immunocytochemical evidence that luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) are present in the same cell type in the rhesus monkey pituitary gland.
Endocrinology 98, 1554-1557 (1976)

Holmes, R.L., Ball, J.N.: The Pituitary Gland. p.19, Cambridge University Press, Cambridge 1974

Holthöfer, H., Virtanen, I., Kariniemi , A.L., Hormia, M., Lindner, E., Miettinen, A.: Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues.
Lab.Invest. 47, 60-66 (1982)

Holthöfer, H., Virtanen, I., Törnroth, I., Miettinen, A.: Alterations in glomerular lectin binding sites of human kidney as detected by fluorescence microscopy.
Histochem.J. 17, 905-912 (1985)

Hsu, S.M., Raine, L.: Protein A, avidin and biotin in immunohistochemistry. J.Histochem.Cytochem. 29, 1349-1353 (1981)

Hsu, S.M., Raine, L.: Versatility of biotin-labeled lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections. J.Histochem.Cytochem. 30, 157-161 (1982)

Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase-complex (ABC) in immunoperoxidase technique: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J.Histochem.Cytochem. 29, 577-580 (1981)

Hughes, R.C., Sharon, N.: Carbohydrates recognized. Nature 274, 637-638 (1978)

Jancik, J., Schauer, R.: Sialic acid - a determinant of the life-time of rabbit erythrocytes. Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem.355 395-400 (1974)

Johnson, H.M.: Human blood group $A_1$ specific agglutinin of the butter clam Saxidomus giganteus. Science 146, 548 (1964)

Kalyan, K., Bahl, O.P.: Role of carbohydrate in human chorionic gonadotropin. J.Biol.Chem. 258, 67-74 (1983)

Kantor, T.G., Schubert, M.: A method for the desulphation of chondroitin sulphate. J.amer.chem.Soc. 79 152 -153 (1957)

Kennedy, J.F.: Chemical Aspects of Highly Purified Human Pituitary Follicle Stimulating Hormone. In: "Gonadotropins nad Gonadal Function". (Moudgal, N.R.ed.) 42-53, Academic Press, New York 1974

Klenk, E.: Chemie und Biochemie der Neuraminsäure. Angew.Chemie 68, 349-356 (1956)

Klessen, C.: Zum Nachweis von Sialinsäure enthaltenden Glykoproteinen in den Mucoidzellen der Adenohypophyse der Ratte. Histochemie 35, 297-306 (1973)

Klessen, C.: Spezifität und Kontrollreaktionen in der Kohlenhydrathistochemie. Acta histochem., Suppl.Bd.XVIII, 45-58 (1977)

Klessen, C.: Demonstration eines Alkali PAS-Effektes bei Verwendung von Perjodsäure in niedriger Konzentration.
Histochemistry 56, 299-305 (1978)

Klessen, C., Graumann, W.: Histochemische Untersuchungen zum KOH/PAS - Effekt.
Acta histochem. Suppl.Bd.XX, 319-323 (1978)

Klessen, C., Rehbein, A.: Zur Schnittmontierung mit Chrom-Gelatine und Formol-Gelatine bei behandlung von Gewebsschnitten mit Perameisensäure.
Histochemsitry 42, 175-179 (1974)

Kocourek, J., Horejsi, V.: Defining a lectin.
Nature 290, 188 (1981)

Kocourek, J., Horejsi, V.: A note on the recent discussion on definition of the term "Lectin". In: Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Vol.III, 3-5, Walter de Gruyter Verlag Berlin 1983

Kornfeld, K., Reitman, ., Kornfeld, R.: The carbohydrate-binding specifity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant.
J.Biol.Chem. 256, 6633-6640 (1981)

Kourides, I.A., Vamvakopoulos, N.C., Maniatis, G.M.: mRNA-directed biosynthesis of  and ß subunits of thyrotropin. Processing of pre-subunits to glycosylated forms.
J.Biol.Chem. 254, 11106-11110 (1979)

Landsteiner, K., Raubitschek, H.: Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination.
Zbl.Bakt.(I.Abt.Orig.) 45, 660-667 (1907)

Lev, R., Spicer, S.S.: A histochemical comparison of human epithelial mucins in normal and hypersecretory states including pancreatic cystic fibrosis.
Amer.J.Pathol. 46, 23-47 (1965)

Lis, H., Sela, B.-A., Sachs, L., Sharon, N.: Specific inhibition by N-acetyl-D-galactosamine of the interaction between soybean agglutinin and animal cell surfaces.
Biochim.Biophys.Acta 211, 582-585 (1970)

Lotan, R.E., Skutelsky, E., Danon, D., Sharon, N.: The purification, composition and specifity of the anti-T lectin from peanut (Arachis hypogeae).
J.Biol.Chem. 250, 8518-8523 (1975)

Manigley, C., Roth, J.: Application of immunocolloids in light microscopy. IV. Use of photochemical silver staining in a simple and efficient double-staining technique.
J.Histochem.Cytochem. 33, 1247 (1985)

Marshall, R.D., Neuberger, A.: Glycoproteins, Their Composition, Structure and Function. In: Glycoproteins (Gottschalk, A. ed.) Part A, Elsevier Amsterdam 1972

McLean, R.L., Suttajit, M., Beidler, J., Winzler, R.T.: N-acetylneuraminic acid analogues. I.Preparations of the 8-carbon and 7-carbon compounds.
J.Biol.Chem. 246, 803-809 (1971)

McManus, J.F.A.: Histological demonstration of mucin after periodic acid.
Nature 158, 202 (1946)

Meindl, P., Tuppy, H.: Darstellung und enzymatische Spaltbarkeit von Ketosiden der N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure.
Mh.Chem. 97, 1628-1647 (1966)

Mirecka, J., Pearse, A.G.E.: Localization of FSH and LH-producing cells in the pig adenohypophysis by an immunohistochemical technique.
Folia histochem.cytochem. 9, 365-371 (1971)

Morell, A.G., Irvine, R.A., Sternlieb, I., Scheinberg, I.H., Ashwell, G.: Physical and chemical studies on ceruloplasmin.
J.Biol.Chem. 243, 155-159 (1968)

Morell. A.G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I.H., Ashwell, G.: The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation.
J.Biol.Chem. 246, 1461-1467 (1971)

Monsigny, M., Roche, A.C., Sene, C., Maget-Dana, R., Delmotte, F.: Sugar-lectin interactions: How does wheatgerm agglutinin bind sialoglycoconjugates?
Eur.J.Biochem. 104, 147-153 (1980)

Montreuil, J.: Primary structure of glycoproteinglycans: basis for the molecular biology of glycoproteins.
Advanc.Carbohyd.Chem.Biochem. 37, 157-223 (1980)

Moriarty, G.C.: Immunocytochemistry of the pituitary glycoprotein hormones.
J.Histochem.Cytochem. 24, 846-863 (1976)

Nakagawa, F., Schulte, B.A., Spicer, S.S.: Glycoconjugate localization with lectin and PA-TCH-SP cytochemistry in rat hypophysis.
Amer.J.Anat. 174, 61-81 (1985)

Nakajima, T., Yamaguchi, H., Takahashi, K.: S-100 protein in folliculo-stellate cells of the rat pituitary anterior lobe.
Brain Res. 191, 523-531 (1980)

Neuberger, A., Ratcliffe, W.A.: The acid and enzymic hydrolysis of O-acetylated sialic acid residues from rabbit Tamm-Horsfall glycoprotein.
Biochem.J. 129, 683-693 (1972)

Neufeld, E.F., Ashwell, G.: Carbohydrate Recognition Systems for Receptor-Mediated Pinocytosis. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. (Lennarz, W.J., ed.) 241-266, Plenum Press New York 1980

Olden, K., Parent, J.B., White, S.L.: Carbohydrate moieties of glycoproteins. A Re-evoluation of their function.
Biochim.Biophys.Acta 650, 209-232 (1982)

Orci, L., Perrelet, A., Ravazzola, M., Malaisse-Lagae, F., Renold, A.E.: A specialized membrane junction between nerve endings and B-cells in islets of Langerhans.
Europ.J.clin.Invest. 3, 443-445 (1975)

Orci, L.: Cellular Relationships in the Islets of Langerhans: A Regulatory Perspective. In: The Importance of Islets of Langerhans for Modern Endocrinology (Federlin, K.F., Scholtholt, J.,eds) 11-26, Raven Press, New York 1984

Pappas, P.W.: The use of a chromalaun-gelatine (subbing) solution as a general adhesive for paraffin sections.
Stain Technol. 46, 121-124 (1971)

Parsons, T.F., Pierce, J.G.: Oligosaccharide moieties of glycoprotein hormones: Bovine lutropin resists enzymatic deglycosylation because of terminal O-sulfated N-acetylhexosamines.
Proc.nat.Acad.Sci., USA 77, 7089-7093 (1980)

Pearse, A.G.E.: The cytochemistry and cytology of the normal anterior hypophysis investigated by the trichrome-periodic acid-Schiff method.
J.Path.Bact. 64, 811-826 (1952)

Pearse, A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and Applied. 3rd ed.Vol.I. 294 ff, Churchill, London 1968

Pereira, M.E.A., Kisailus, E.C., Gruezo, G., Kabat, E.A.: Immunochemical studies on the combining site of the blood-group H specific lectin 1 from ulex europaeus seeds.
Arch.Biochem.Biophys. 185, 108-115 (1978)

Phifer, R.F., Midgley, A.R., Spicer, S.S.: Histology of the Human Hypophyseal Gonadotropin Secreting Cells. In: Gonadotropins. (Saxena, B., Beling, C., Morteuse, M.G. eds), 9-25, John Wiley and Sons, New York 1972

Phifer, R.F., Spicer, S.S.: Immunohistochemical and histologic demonstration of thyrotropic cells of the human adenohypophysis.
J.clin.Endocrin.Metabl. 36, 1212-1221 (1973)

Pierce, J.G.: Chemistry of Thyroid-Stimulating Hormone. In: Handbook of Physiology (Knobil, E., Sawyer, W.H. eds) Sec.7 Endocrinology Vol.IV, Part 2, 79-101, Amer.Physiol.Soc., Washington DC 1974

Pierce, J.G., Faith, M.R., Giudice, L.C., Reeve, J.R.: Structure and structure-function relationship in glycoprotein hormones.
In: Polypeptide Hormones: Molecular and Cellular Aspects.
Ciba Found.Symp. 41, 225-250, Elsevier Amsterdam 1976

Ponsin, G., Mornex, R.: Control of thyrotropin glycosylation in normal rat pituitary cells in culture: Effect of thyrotropin-releasing hormone.
Endocrinology 113, 549-556 (1983)

Purves, H.D., Griesbach, W.E.: The site of thyrotropin and gonadotropin production in the rat pituitary studied by McManus-Hotchkiss staining for glycoprotein.
Endocrinology 49, 244-264 (1951)

Purves, H.D., Griesbach, W.E.: The site of follicle stimulating and luteinizing hormone production in the rat pituitary.
Endocrinology 55, 785-793 (1954)

Purves, H.D., Griesbach, W.E.: Change in the gonadotrophes of the rat pituitary after gonadectomy.
Endocrinology 56, 374-386 (1955)

Quintarelli, G.: Histochemical identification of salivary mucins.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 106, 339-363 (1963)

Quintarelli, G., Scott, J.E., Dellovo, M.C.: The chemical and histochemical properties of Alcian Blue. III.Chemical blocking and unblocking.
Histochemie 4, 99-112 (1964)

Reid, P.E., Culling, C.F.A., Dunn, W.L.: The histochemical interpretation of the complex results of methylation upon gastrointestinal tract mucins, with special reference to the periodic acid-Schiff reactivity.
J.Histochem.Cytochem. 22, 986-991 (1974)

Reid, P.E., Culling, C.F.A.: The periodate oxidation of carbohydrates in relation to the PAS reaction.
Histotechnol. 3, 82-90 (1980)

Reutter, W., Köttgen, E., Bauer, Ch., Gerok, W.: Biological Significance of Sialic Acids. In: Sialic Acid Chemistry, Metabolism and Function (Schauer, R. ed.) Cell Biol.Monographs Vol.10
263-305, Springer Verlag Wien 1982

Rice, R.H., Etzler, M.E.: Chemical modification and hybridization of wheat germ agglutinins.
Biochemistry 14, 4093-4099 (1975)

Roberts, G.P.: Histochemical detection of sialic residues using periodate oxidations.
Histochem.J. 9, 97-102 (1977)

Romeis, B.: Mikroskopische Technik. 16.Aufl. R.Oldenbourg, München-Wien 1968

Roth, J.: Application of immunocolloids in light microscopy: Preparation of protein A-silver and protein A-gold complexes and their application for localization of single and multiple antigens in paraffin sections.
J.Histochem.Cytochem. 30, 691-696 (1982)

Roth, J.: Application of immunocolloids in light microscopy: II.Demonstration of lectin-binding sites in paraffin sections by the use of lectin-gold or glycoprotein-gold complexes.
J.Histochem.Cytochem. 31, 541-552 (1983)

Rothman, J.E., Lenhard, J.: Membrane traffic in animal cells.
TIBS 9, 176-178 (1984)

Roussel, F.: Marquage immunoperoxidasique (PAP) des vaisseaux sanguins par trois lectins: UEA I, LTA, DBA.
C.R.Soc.Biol. 179, 59-69 (1985)

Ruddon, R.W., Hanson, C.A., Addison, N.J.: Synthesis and processing of human chorionic gonadotropin subunits in cultured choriocarcinoma cells.
Proc.nat.Acad.Sci. USA 76, 5143-5147 (1979)

Sage, H.J., Connett, S.L.: Studies on a hemagglutinin from the meadow mushroom.
J.Biol.Chem. 244, 4713-4719 (1969)

Sairam, M.R., Papkoff, H.: Chemistry of Pituitary Gonadotrophins. In: Handbook of Physiology. (Knobil, E., Sawyer, W.H. eds) Sec.7 Endocrinology Vol.IV Part 2, 111-131, Amer.Phys.Soc. Washington DC 1974

Schachter, H., Roseman, S.: Mammalian Glycosyltransferases; Their Role in the Synthesis and Function of Complex Carbohydrates and Glycolipids. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. (Lennarz, W.J. ed.) 85-160, Plenum Press New York 1980

Schauer, R.: Biosynthese und enzymatischer Abbau von Acylneuraminsäuren.
Instrument und Forschung (Lorch) 3, 21-41 (1975)

Schauer, R.: Characterization of Sialic Acid. In: Methods of Enzymology. (Ginsburg, V. ed.) Vol.50, 65, Academic Press New York 1978

Schauer, R., Faillard, H.: Zur Wirkungsspezifität der Neuraminidase. Das Verhalten isomerer N.O-Diacetyl-neuraminsäureglykoside im Submaxillarmucin von Pferd und Rind bei Einwirkung bakterieller Neuraminidase.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.349, 961-968 (1968)

Schauer, R,, Vliegenthart, J.F.G.: Introduction. In: Sialic Acids. Chemistry, Metabolism and Function. (Schauer, R.ed.) Cell Biol.Monographs Vol.10, p.1, Springer Verlag Wien - New York 1982

Schmitz-Moormann, P.: Zur Histochemie der Neuraminsäure.
Histochemie 20, 78-86 (1969)

Schulte, B.A., Spicer, S.S.: Histochemical methods for characterizing secretory and cell surface sialoconjugates.
J.Histochem.Cytochem. 33, 427-438 (1985)

Sharon, N.: Complex Carbohydrates. Their Chemistry, Biosynthesis and Functions. Addison-Wesley Publ.Co. London 1975

Sharon, N.: Lectins
Sci.Amer. 236, 108-119 (1977)

Sharon, N.: Glycoproteins
TIBS 9, 198-202 (1984)

Sharon, N., Lis, H.: Lectin-agglutinating and sugar-specific proteins.
Science 177, 949-959 (1972)

Shirasawa, N., Kihara, H., Yamaguchi, S., Yoshimura, F.: Pituitary folliculo-stellate cells immunostained with S-100 protein antiserum in postnatal, castrated and thyroectomized rats.
Cell Tiss.Res. 231, 235-249 (1983)

Shome, B., Parlow, A.F.: Human follicle stimulating hormone (hFSH): First proposal for the amino acid sequence of the α-unit (hFSH ) and first demonstration of its identity with α-subunits of human luteinizing hormone (hLHα).
J.Clin.Endocrin.Metab. 39, 199 (1974)

Sorvari, T.E., Soward, P.J.: Saponification of methylated mucosubstances at low temperatures.
Stain Technol. 46, 49-52 (1972)

Spicer, S.S., Warren, L.: The histochemistry of sialic acid containing mucoproteins.
J.Histochem.Cytochem. 8, 135-137 (1960)

Spiro, R.G.: Glycoproteins
Amer.Rev.Biochem. 39, 599-638 (1970)

Springer, G.F., Desai, P.R.: Extent of desialisation of blood group MM, NN and MN antigens required for reactivity with anti-T-antibody and Arachis hypogaea lectin.
J.Biol.Chem. 275, 2744-2746 (1982)

Sternberger, L.A.: Immunocytochemistry. 2nd Ed. John Wiley and Sons. New York 1979

Sternberger, L.A., Hardy, P.H.,Jr., Cuculis, J.J., Meyer, H.G.: The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes.
J.Histochem.Cytochem. 18, 315-333 (1970)

Stillmark,H.: Über Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen.
Thesis, Dorpat 1888

Stoward, P.J., Spicer, S.S., Miller, R.L.: Histochemical reactivity of peanut lectin-horseradish peroxidase conjugate.
J.Histochem.Cytochem. 28, 979-990 (1980)

Suttajit, M., Reichert, L.E.,Jr., Winzler, R.J.: Effect of modification of N-acetylneuraminic acid on the biological activity of human and ovine follicle-stimulating hormone.
J.Biol.Chem. 246, 3405-3408 (1971)

Tougard, C.: Picard, R., Tixier-Vidal, A.: Immunocytochemical localization of glycoprotein hormones in the rat anterior pituitary. A light and electron microscopic study using antisera against rat ß-subunits: a comparison between preembedding and post-embedding methods.
J.Histochem.Cytochem. 28, 101-114 (1980)

Tramu, G., Pillez, A., Leonardelli, J.: An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry.
J.Histochem.Cytochem. 26, 322-324 (1978)

Vaudry, H., Peeletier, G., Guy, J., Leclerc, R., Jeyou, S.: Immunohistochemical localization of γ-endorphin in the rat pituitary gland and hypothalamus.
Endocrinology 106, 1512-1520 (1980)

Veh, R.W., Corfield, A.P., Schauer, R., Andres, K.H.:The bovine submandibular gland.II.Histochemical and biochemical results. In: Glycoconjugates (Schauer, R., Boer, P., Buddeke, E., Kramer, M.F., Vliegenthart, J.F.G., Wiegandt, H., eds) 193-194, G.Thieme, Stuttgart 1979

Ward, D.N., Reichert, L.E.,Jr., Fitak, B.A., Nahm, H.S., Sweeney, C.M., Neill, J.D.: Isolation and properties of subunits of rat pituitary luteinizing hormone.
Biochemistry 10, 1796-1802 (1970)

Weber, P., Harrison, F.W., Hof, L.: The histochemical application of dansylhydrazine as a fluorescent labeling reagent for sialic acid in cellular glycoconjugates.
Histochemistry 45, 271-277 (1975)

Weintraub, B.D., Stannard, B.S., Linnekin, D., Marshall, M.: Relationship of glycosylation to de novo thyroid-stimulating hormone biosynthesis and secretion by mouse pituitary tumor cells. J.Biol.Chem. 255, 5715-5723 (1980)

Williams, M.A.: Autoradiography and immunocytochemistry. In: Practical methods in electron microscopy (Glauert, A.M. ed.) 175, North Holland Publ.Comp., Amsterdam, New York, Oxford 1977

Wood, G.S., Warnke, R.: Suppression of endogenous avidin-biotin activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. J.Histochem.Cytochem. 29, 1196-1204 (1981)

# Lektinhistochemische und immuncytochemische Untersuchungen zur Charakterisierung hormonbildender Zellen der Adenohypophyse der Ratte

Inaugural-Dissertation
von Martin Witt

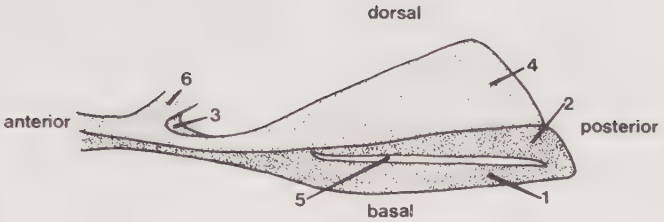
Teil II

Abbildungen

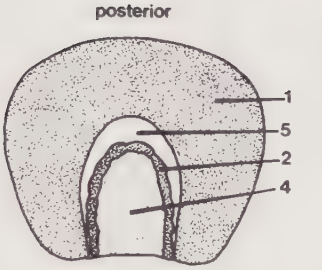
Abb.1A und B: Hypophyse der Ratte.
Schnittebenen: A = mediansagittal, B = horizontal
Adenohypophyse: 1= Pars distalis, 2= Pars intermedia
3= Pars tuberalis.
4= Neurohypophyse, 5= Hypophysenspalt, 6= Infundibulum
Balken (A) = 0,8 mm Balken (B) = 0,6 mm

Aus den Abbildungen geht nicht hervor, daß die Seitenlappen der Pars distalis die Neurohypophyse überragen.
(modif. nach Holmes und Ball, 1974)

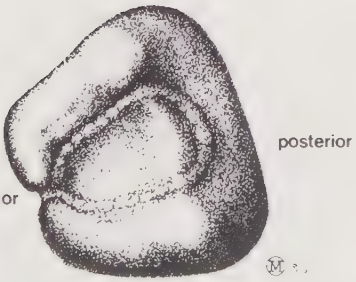
Abb.1C : Aufsicht auf die Hypophyse der Ratte von oben (dorsal)
Balken = 0,8 mm


dorsal
6
4
anterior
3
2
posterior
5
basal
1

1A

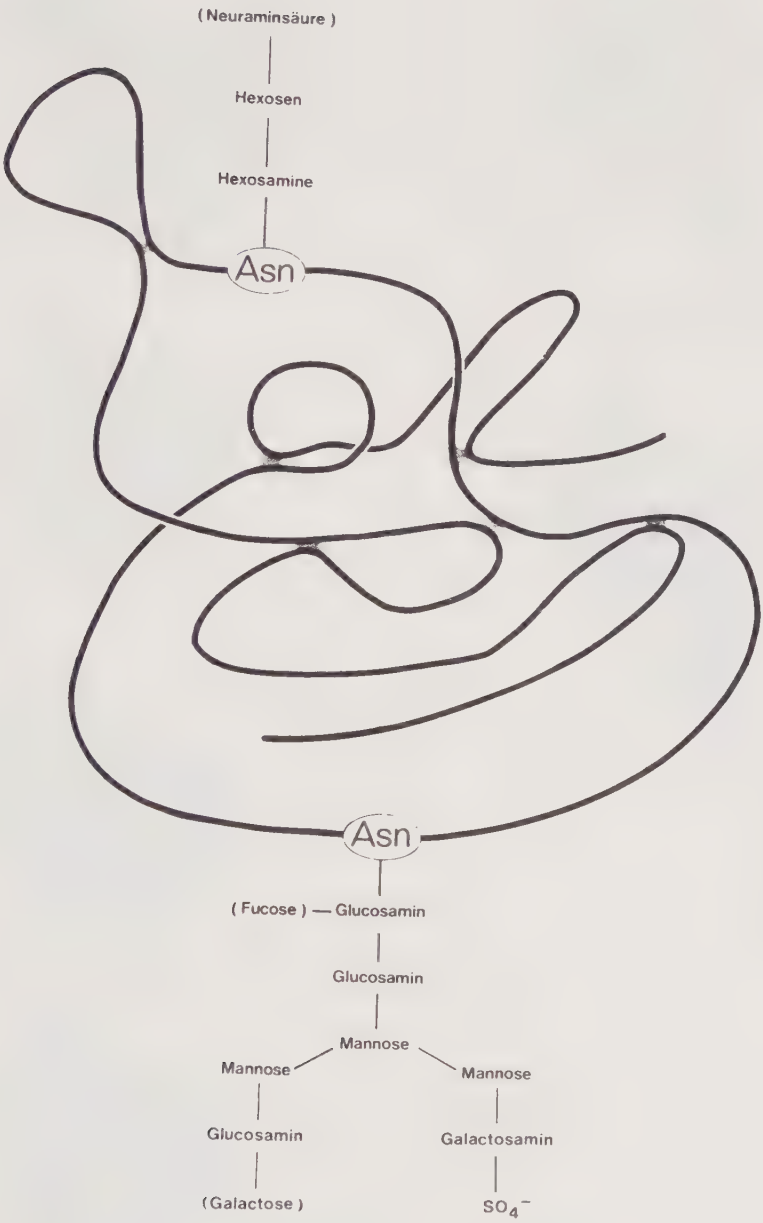

posterior
1
5
2
4
anterior

1B


posterior
anterior

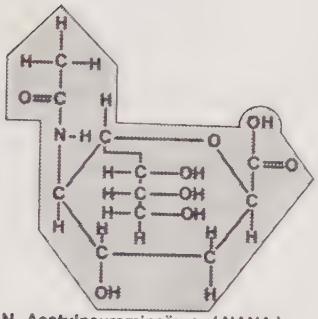
1C

Abb.2: Hypothetisches Schema einer Glykoproteineinheit (z.B. LH-α).
Die durchgezogene Linie stellt die Peptidkette dar, an welche über Asparagin (Asn) N-glykosidisch die Kohlenhydratketten geknüpft sind.
Schraffierte Zonen symbolisieren Disulfidbrücken
Neuraminsäure,Fucose und Galactose sind nicht regelmäßig vorhanden

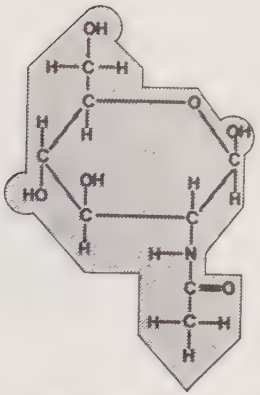

( Neuraminsäure )
Hexosen
Hexosamine
Asn
Asn
( Fucose ) — Glucosamin
Glucosamin
Mannose
Mannose
Mannose
Glucosamin
Galactosamin
( Galactose )
$SO_4^-$

2

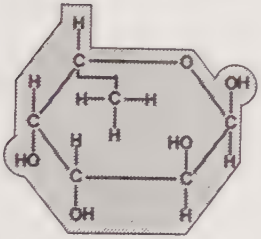
Abb.3: Strukturformeln der in KH-Ketten der Glykoproteinhormone vorkommenden Monosaccharide: Die Umrandung der einzelnen Zuckerreste soll auf die komplementäre Bindungsstelle am entsprechenden Lektin hinweisen (mod.nach Sharon 1972).



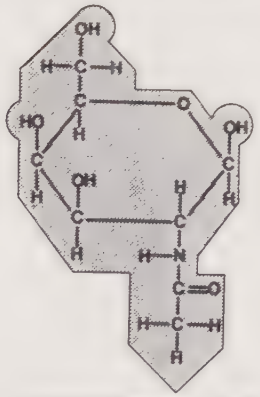
N-Acetylneuraminsäure (NANA)



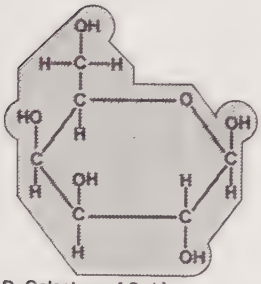
N-Acetylglucosamin (GlcNAc)



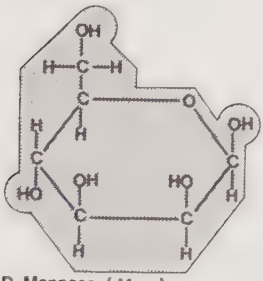
L-Fucose (Fuc)



N-Acetylgalactosamin (GalNAc)

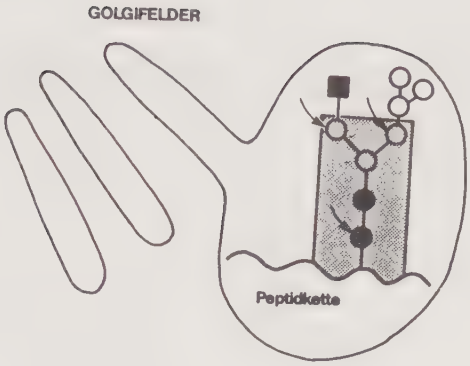


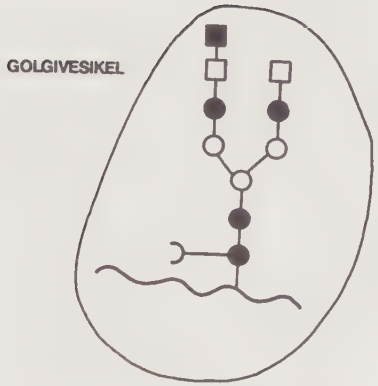
D-Galactose (Gal)



D-Mannose (Man)

Abb.4: Schematische Darstellung der Glykosylierung eines Glykoproteins im Golgi-Apparat.
Oben: Die Oligosaccharidkerneinheit (eingerahmt) wird vorübergehend mit Zuckerresten besetzt (Polymannosyläste), welche im Laufe des Glykosylierungsprozesses wieder durch Glykosyltransferasen (Pfeile) abgebaut werden.
Mitte und unten: Das reife Molekül wird ausgeschleust.
● = GlcNAc, ○ = Man, □ = Gal, ■ = NANA )— = Fuc
(modifiziert nach Schachter und Roseman 1980)


GOLGIFELDER
Peptidkette


GOLGIVESIKEL

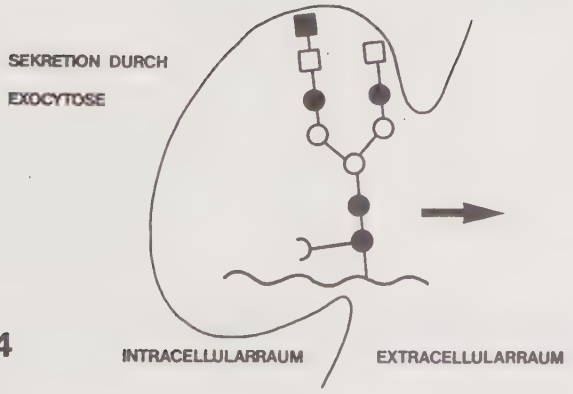
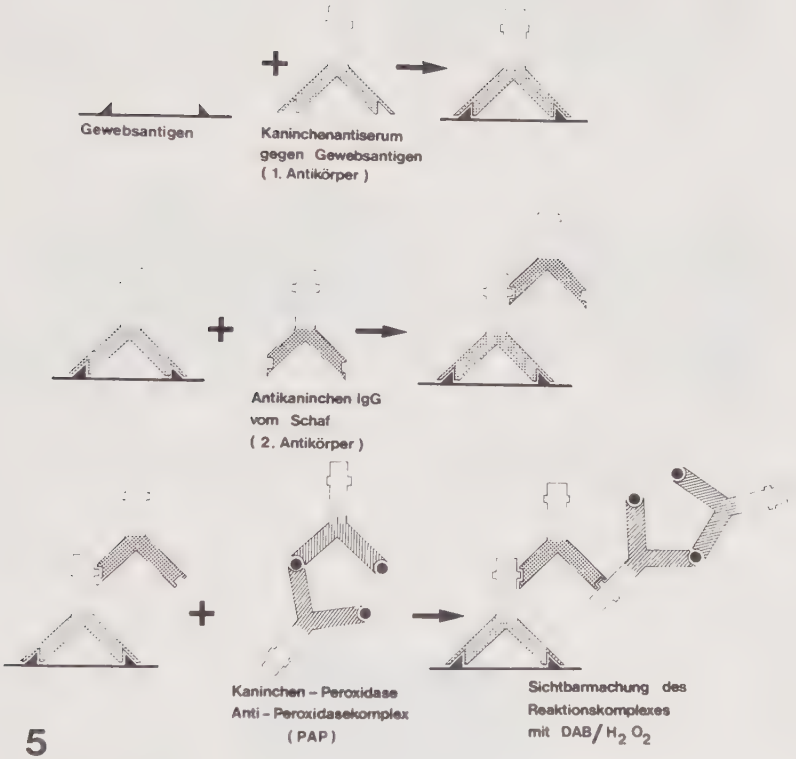

SEKRETION DURCH
EXOCYTOSE
INTRACELLULARRAUM
EXTRACELLULARRAUM

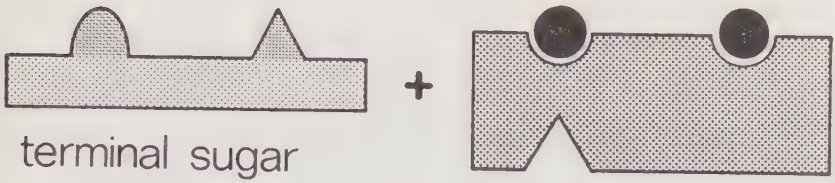
Abb.5: Schematische Darstellung der Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Methode (modif.n.Girod 1983; Erläuterung s.S.30)


Gewebsantigen
Kaninchenantiserum
gegen Gewebsantigen
( 1. Antikörper )
Antikaninchen IgG
vom Schaf
( 2. Antikörper )
Kaninchen – Peroxidase
Anti – Peroxidasekomplex
( PAP )
Sichtbarmachung des
Reaktionskomplexes
mit DAB/$H_2O_2$

5

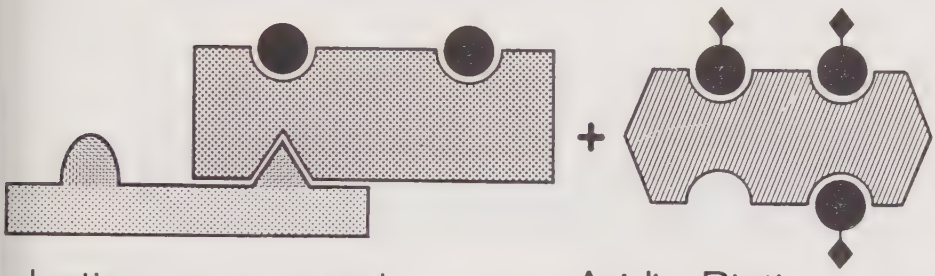
Abb.6: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin/Peroxidase-Complex (ABC)-Methode (Erläuterung s.S.33)

# Detection of Carbohydrates with Biotinylated Lectins



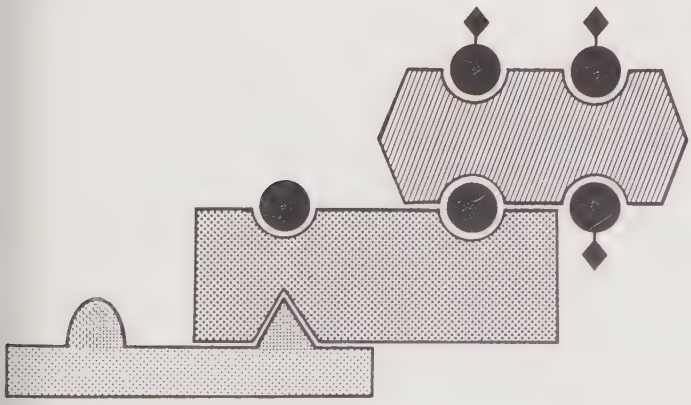
terminal sugar

biotinylated lectin



lectin-sugar-complex

Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC)



6 Visualization with DAB-$H_2O_2$

Abb.7: Inhibition eines Lektins

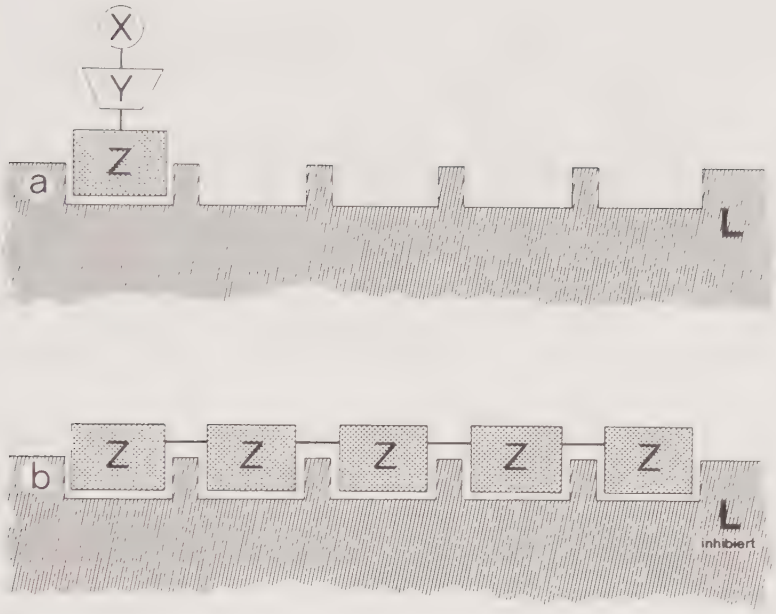
a: Lektin (L) bindet den Zucker (Z), was zu einer positiven Reaktion im Schnitt führt

b: Zur vollständigen Inhibition des Lektins können aber weitere Zuckerreste (Z) notwendig sein. Demzufolge repräsentiert der beste Inhibitor für ein Lektin nicht unbedingt den wahren Lektin-rezeptor im Gewebe (X-Y-Z: terminale Zuckerreste).

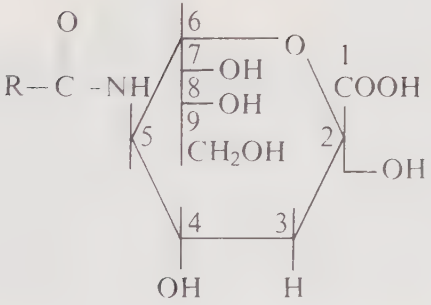
Abb.8: Strukturformel der Sialinsäure

R = $CH_3$ = N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA)

R = $CH_2OH$ = N-Glykolyl-Neuraminsäure (NGNA)


X
Y
Z
a
L
b
Z
Z
Z
Z
Z
L
inhibiert

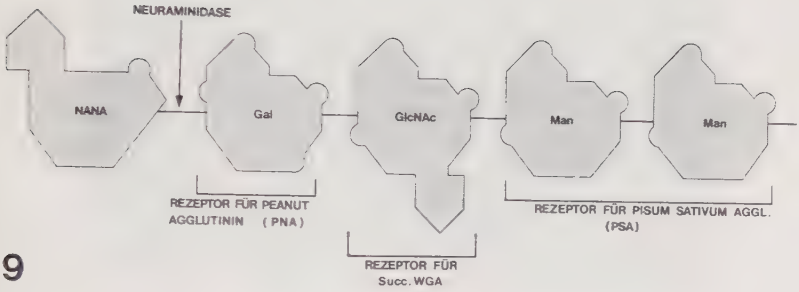
7


O
R—C -NH
6
7
OH
8
OH
9
CH2OH
5
O
1
COOH
2
OH
4
3
OH
H

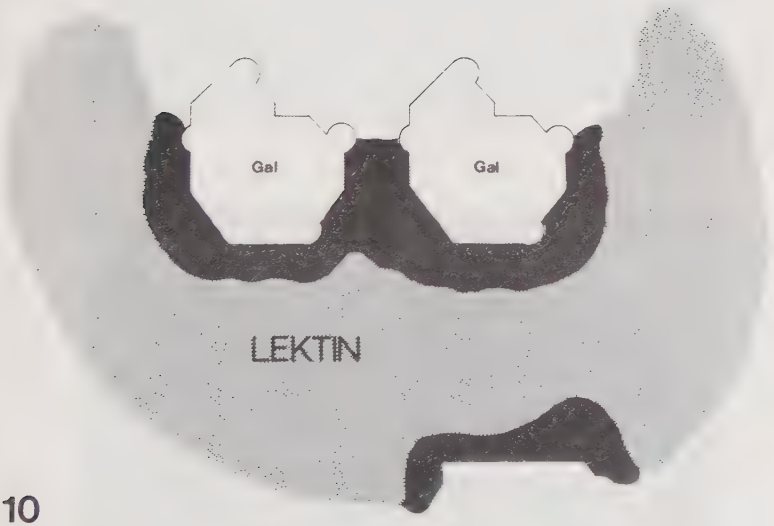
8

Abb.9: Terminale Monosaccharidsequenz der KH-Kette eines Glykoproteins. Abspaltung von NANA durch Neuraminidase legt PNA-Rezeptor Gal frei (modif. nach Sharon 1972)

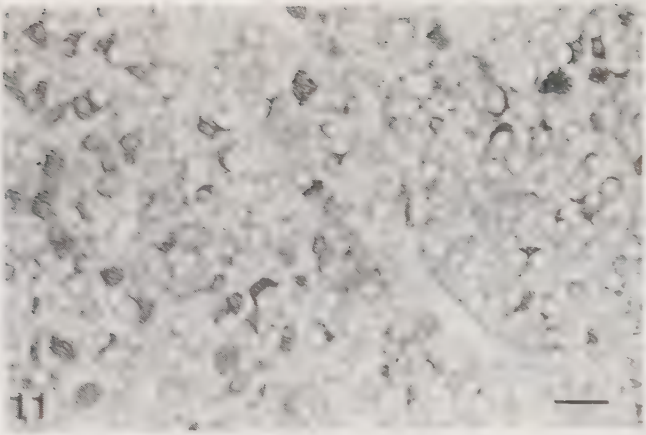
Abb.10: Schema einer Lektin-Zucker-Bindung. Das Lektin besitzt besondere Molekülbezirke (schwarze Fläche), die nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip spezifische Zuckerreste (hier: Gal) binden können. Andere Zuckerbindungsstellen bleiben frei, wenn das entsprechende Monosaccharid im Gewebe nicht vorhanden oder für das Lektin nicht zugänglich ist.


NEURAMINIDASE
NANA
Gal
GlcNAc
Man
Man
REZEPTOR FÜR PEANUT AGGLUTININ (PNA)
REZEPTOR FÜR Succ. WGA
REZEPTOR FÜR PISUM SATIVUM AGGL. (PSA)

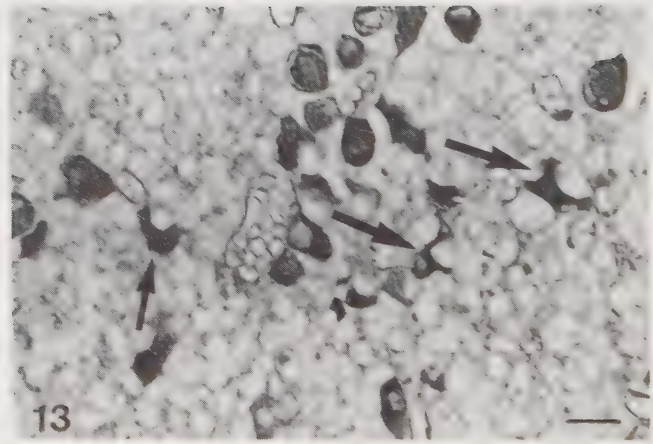
9


Gal
Gal
LEKTIN

10


11

12

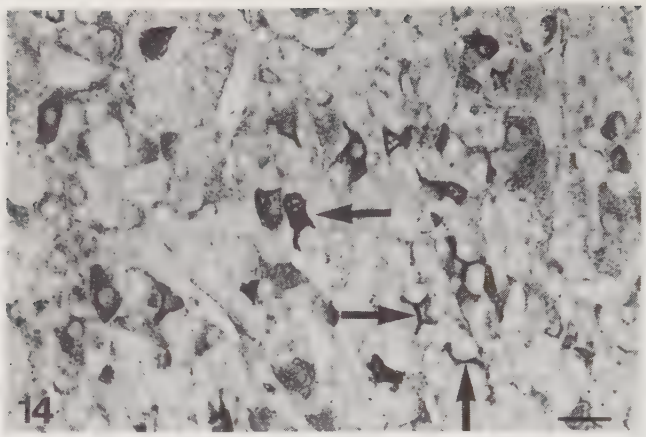

13

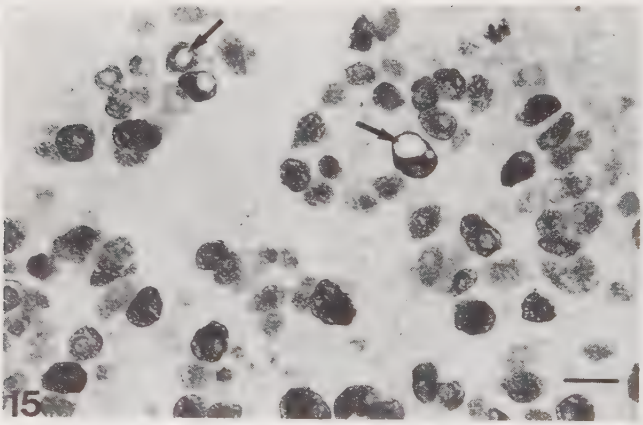
Abbildungen 11 bis 21: Lektinreaktionen zum Nachweis spezifischer Zuckerreste in den Zellen des HVL der Ratte

Abb.11: PSA
Reaktion runder, ovaler und polygonaler Mannose-haltiger Zellen
Vergrößerung: 426x, Balken = 23 µm

Abb.12: SBA
Reaktion fällt praktisch negativ aus. Lediglich die bindegewebige Organkapsel enthält dem Lektin zugängliche GalNAc-Reste
Vergrößerung: 333x, Balken = 30 µm

Abb.13: Neuraminidase-SBA
Starke Reaktion runder und polygonaler Zellen. Vereinzelt umschließen diese andere, nicht reagierende Zellen (Kohabitation: Pfeile)
Vergrößerung: 682x, Balken = 15 µm


14


15

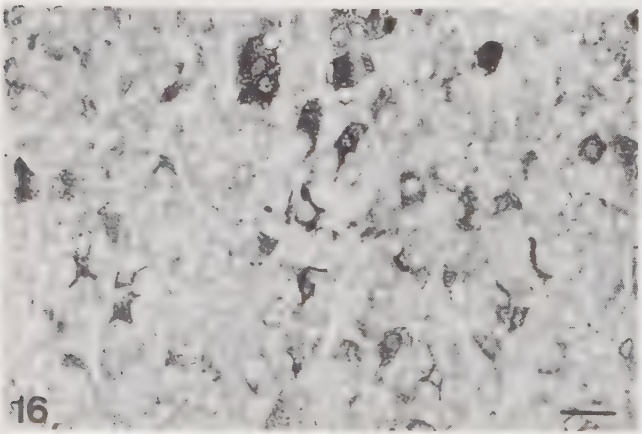
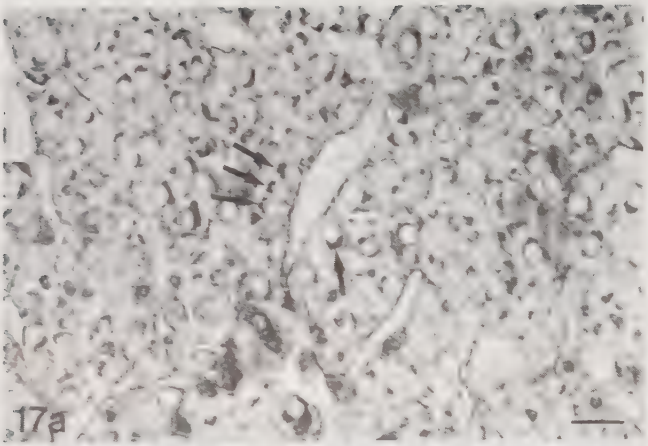

16

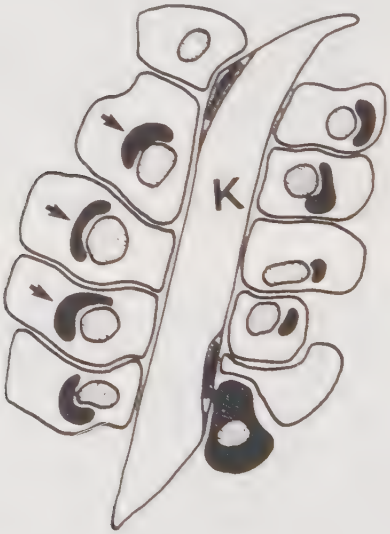
Abb.14: S-WGA
Darstellung runder, ovaler, aber auch polygonaler Zellen mit langen cytoplasmatischen Ausläufern (Pfeile), die andere Zellen umschließen
Vergrößerung: 533x, Balken = 19 µm

Abb.15: S-WGA
Im medioanterioren Bereich Reaktion fast ausschließlich runder Zellen, gelegentlich mit Vakuolen (Pfeile)
Vergrößerung: 426x, Balken = 23 µm

Abb.16: Neuraminidase - S-WGA
Gegenüber Abb.14 keine Veränderungen. Reaktion runder und polygonal geformter Zellen
Vergrößerung: 533x, Balken = 19 µm



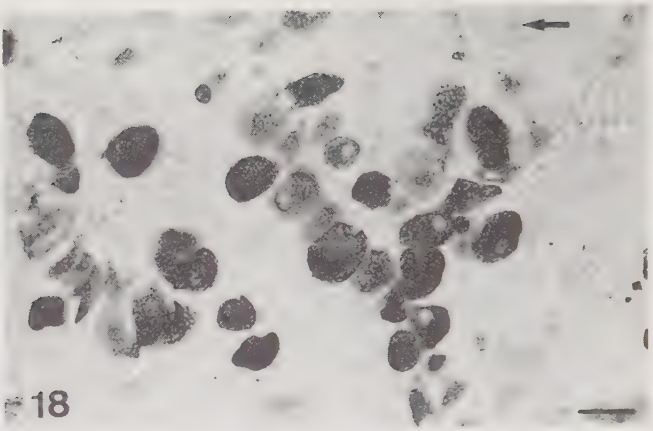
17a

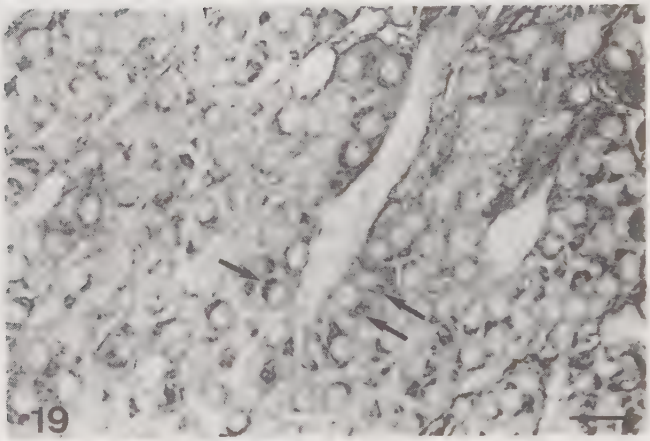



17b

Abb.17a: DBA
Markierung der Golgi-Felder zahlreicher HVL-Zellen (Pfeile).
Auffallend ist die blutgefäßabgewandte Lage der Golgi-Felder.
Vergrößerung: 533x, Balken = 19 µm

Abb.17b: Schematische Darstellung der kapillarabgewandten Golgi-Felder (Pfeile) (Vgl. 17a). K = Kapillare


18


19

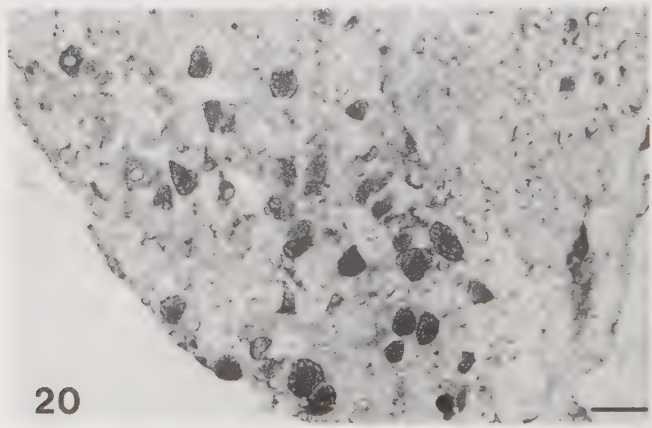
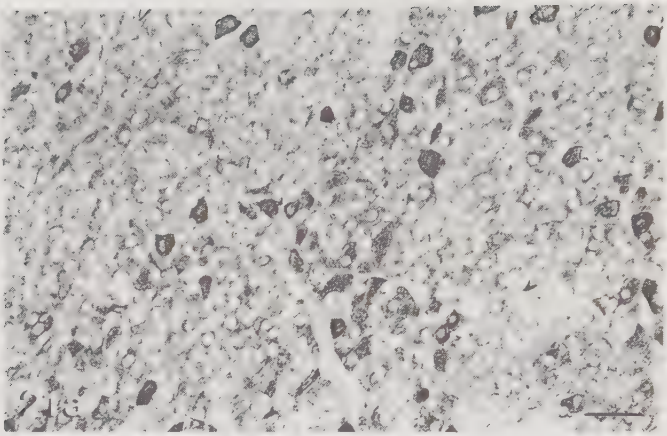

20

Abb.18: Neuraminidase-DBA
Darstellung großer und kleiner runder Zellen, die oft um Blutgefäße gruppiert sind. Keine polygonalen Zellen. Golgi-Felder sind nur noch andeutungsweise zu identifizieren (Pfeil).
Dichte Granulierung des Lektin-positiven Materials.
Vergrößerung: 533x, Balken = 19 µm

Abb.19: UEA I
Ähnlicher Reaktionsausfall wie bei DBA (vgl. Abb.17a).
Golgi-Felder sind kapillarentfernt vom Kern gelegen (Pfeile)
Vergrößerung: 682x, Balken = 15 µm

Abb.20: Neuraminidase-UEA I
Reaktion runder und ovaler Zellen, hauptsächlich medioanterior.
Vergrößerung: 333x, Balken = 30 µm



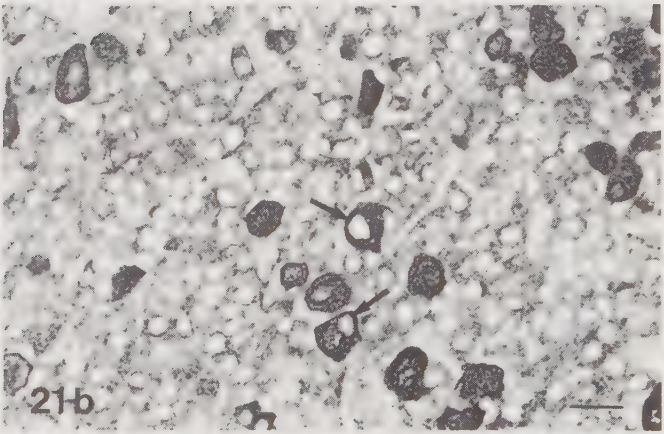
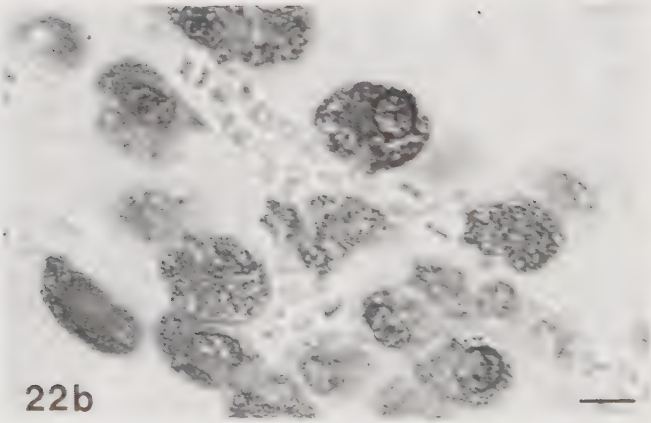

21b

Abb.21a und b: Neuraminidase-PNA

Unterschiedlich starke Reaktion runder und ovaler Zellen.
Gelegentlich Auftreten von Vakuolen (Pfeile).
Vergrößerung a: 333x, Balken = 30 µm
b: 533x, Balken = 19 µm

22a

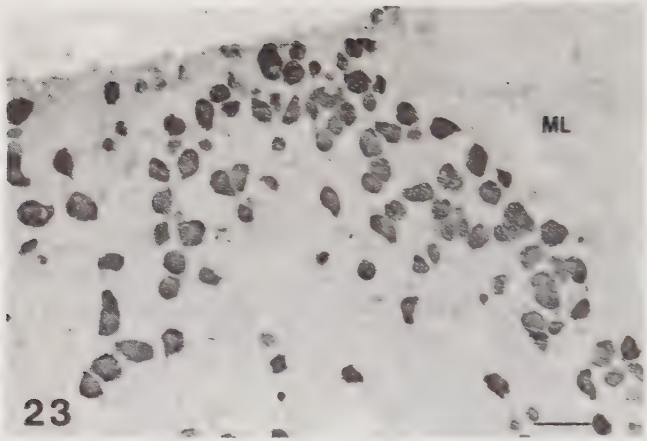


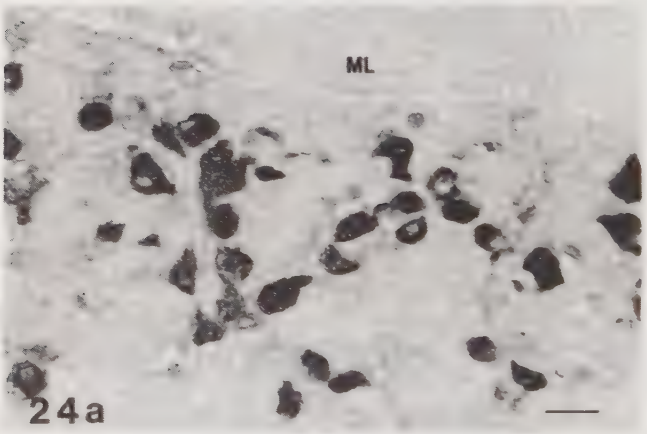
22b

Abb.22 bis 24: Immunocytochemische Reaktion der TSH-Zellen

Abb.22a und b: TSH

Darstellung runder bis ovaler (22a) sowie stark polygonaler Zellen (22a) mit langen cytoplasmatischen Ausläufern. Phänomen der Kohabitation (vgl. Abb.11, 14).
Vergrößerung a: 2133x, Balken = 7,5 µm
b: 1333x, Balken = 4,7 µm


ML
23


ML
24a

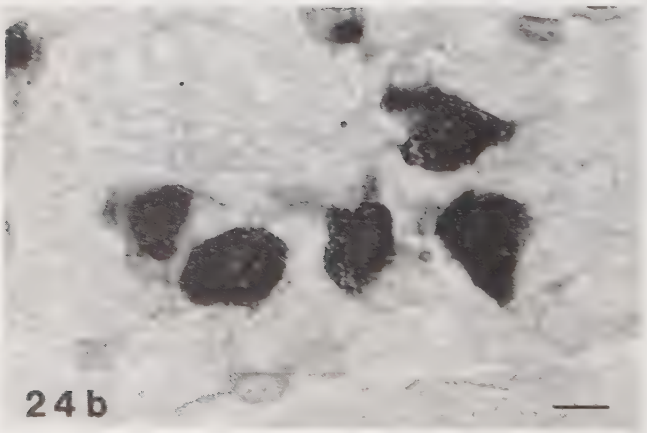
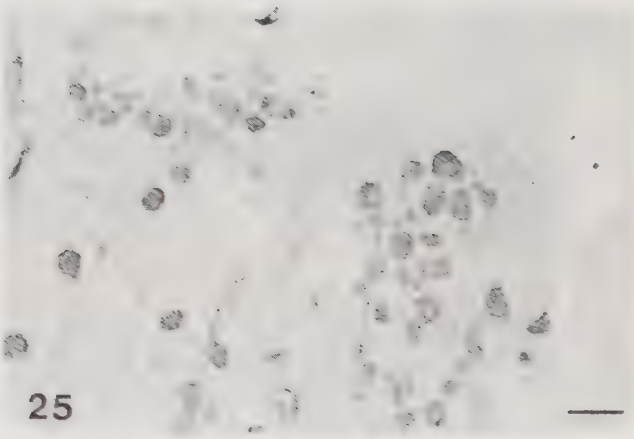

24b

Abb.23: LH

Vorkommen runder und ovaler Zellformen in der medioanterioren Region an der Grenze zum Mittellappen (ML)
Vergrößerung: 333x, Balken = 30 µm

Abb.24a und b: FSH

Reaktion runder und ovaler Zellen. Dichte Granulierung des Zellmaterials. Die FSH-positiven Zellen reihen sich oft um Blutgefäße. Mittellappen am oberen Bildrand (ML).
Vergrößerung a: 533x, Balken = 19 µm
b: 1333x, Balken = 7,5 µm


25

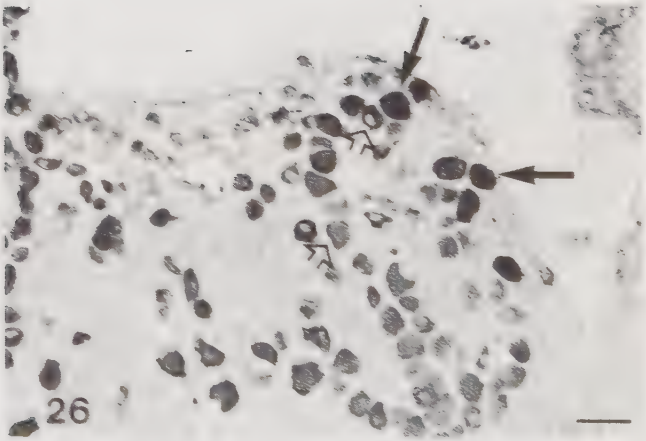
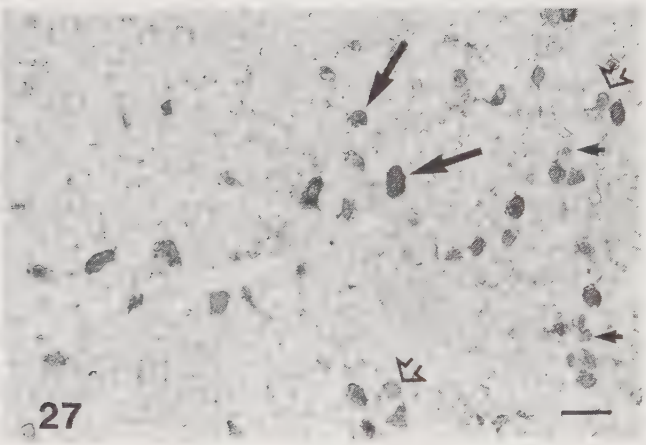

26

Abb.25 bis 31: Kombination lektinhistochemischer mit immuncytochemischer Methoden.

Abb.25: PNA - LH
Ausschließlich Darstellung LH-positiver, im Original blaßbrauner, runder Zellen in medioanteriorer Gegend.
Vergrößerung: 333x, Balken = 30 µm

Abb.26: Neuraminidase/PNA - LH
Reine LH-Zellen sind nicht nachzuweisen. Deutliche Reaktion PNA-positiver, im Original dunkelbraun gefärbter Zellen (dunkle Pfeile) und Mischformen (offene Pfeile) sind zu unterscheiden. Wahrscheinlich enthält ein Teil der massiv PNA-markierten Zellen auch LH.
Vergrößerung: 333x, Balken = 30 µm


27

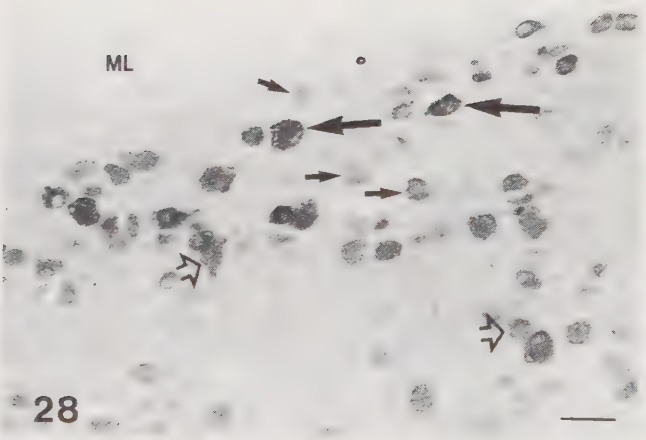

ML
28

Abb.27: Neuraminidase-UEA I - LH
Es sind drei Zellgruppen nachzuweisen: Auf UEA reagierende braun gefärbte Zellen (große Pfeile), auf Anti-LH reagierende hellblaue Zellen (kleine Pfeile) sowie Mischformen (offene Pfeile).
Vergrößerung: 333x, Balken = 30 µm

Abb.28: Neuraminidase-DBA - LH
Es überwiegen DBA-positive braungefärbte Zellen (große Pfeile). "Reine" im Original blaue LH-Zellen (kleine Pfeile) und Mischformen, im Original blau-braun (offene Pfeile) sind ebenfalls nachzuweisen (ML = Mittellappen)
Vergrößerung: 333x, Balken = 30 µm

29


30


31

Abb. 29 Neuraminidase - SBA - LH
SBA-positive braungefärbte Zellen sind in runden und polygonalen Formen nachweisbar (große Pfeile). "Reine" blaugefärbte LH-Zellen (kleine Pfeile) sind ebenso zahlreich wie Mischformen (offene Pfeile).
Vergrößerung: 333x, Balken = 30 µm

Abb.30 Neuraminidase - SBA - FSH
In der medioanterioren Gegend sind nur runde S-WGA - positive (große Pfeile) und kleine "reine" FSH-Zellen (kleine Pfeile) zu identifizieren. Mischformen sind von S-WGA - positiven Zellen nicht zu unterscheiden.
Vergrößerung: 333x , Balken = 30 µm

Abb.31 Neuraminidase - UEA - TSH
TSH-Zellen (bläulich) sind an ihrer polygonalen Form zu erkennen (kleine Pfeile), können aber auch als runde Zellen erscheinen. UEA-positive, dunkelbraun gefärbte Zellen (große Pfeile) und Zellen, in denen TSH und Fucose gemeinsam nachweisbar sind (offene Pfeile), kommen ebenfalls vor.
Vergrößerung: 333x , Balken = 30 µm

# D A N K S A G U N G

Für die Anregung zu der vorliegenden Dissertation, die Bereitschaft zur Diskussion rund um die Uhr sowie die Hilfe bei der schriftlichen Abfassung der Arbeit möchte ich Herrn Prof.Dr.Ch.Klessen meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof.Dr.M.Arnold, der die Arbeit durch besonderes Interesse und großzügige Unterstützung förderte.

Frau E.Maier und Frau U.Heni fertigten die mikroskopischen Präparate an; Herr M.Nicolescu besorgte die Zeichnungen, Herr P.M.Weber die photographischen Reproduktionen. Frau B.Wendt-Schneider fertigte das Manuskript an, und Frau B.Klaas, last but not least, sprach mir fortlaufend Mut zu.

Ihnen allen gilt für ihre hervorragende Arbeit mein besonderer Dank.

## Lebenslauf

Am 13.6.1956 wurde ich, Martin Witt, als Sohn des Dr. med. Hans-Jürgen Witt und der Ursula Witt, geb. Jäde, in Göttingen geboren. Dort besuchte ich von 1963 bis 1966 die Volksschule. Anschließend besuchte ich das Alte Gymnasium in Flensburg, wo ich 1975 die Reifeprüfung bestand. Nach dem Wehrdienst absolvierte ich von 1976 bis 1977 die einjährige Krankenpflegehilfeausbildung.

Das Studium der Medizin begann ich 1977 in Turin, setzte es 1978 in Hamburg fort, um es dort - nach einem Studienjahr in Graz - am 15.11.1983 mit dem Staatsexamen und Approbation zum Arzt abzuschließen.

Am 2.4.1983 heiratete ich Hanna Kozińska aus Krakau. Seit März 1984 bin ich als wissenschaftlicher Angestellter am Anatomischen Institut in Tübingen tätig. Dort fertigte ich die vorliegende Dissertation an.

Druck Köhler Tübingen